




Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Tesi doctoral / Doctoral thesis:

**Estudi epidemiològic i dels patrons antimicrobians del bacteri
intracel·lular facultatiu *Legionella* a l'ambient.**

**Environmental epidemiology and antimicrobial surveillance of the
facultative intracellular bacteria *Legionella*.**

Tíscar Graells

Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Biociències

Departament de Genètica i de Microbiologia

Programa de Doctorat en Microbiologia

Bellaterra, 2018

Tesi doctoral / Doctoral thesis:

Estudi epidemiològic i dels patrons antimicrobians del bacteri intracel·lular facultatiu *Legionella* a l'ambient.

Environmental epidemiology and antimicrobial surveillance of the facultative intracellular bacteria *Legionella* in the environment.

Autora / Author: **Tíscar Graells**

Directora / Supervisor: **Emma Padilla**

Tutor / Co-supervisor: **Jordi Mas**

Tesis doctoral realitzada al Servei de Microbiologia de Catlab Centre Analítiques AIE i al Departament de Bioquímica mèdica i Microbiologia de la Universitat d'Uppsala, com a estada internacional, amb el vistiplau de la Directora i Tutor:

Thesis done in the Microbiology Department at Catlab Centre Analítiques AIE and in the Department of Medical Biochemistry and Microbiology at Uppsala University, as international internship, with the approval of the supervisor and co-supervisor:

Tíscar Graells

Emma Padilla

Jordi Mas

Bellaterra, Setembre 2018.

Tesis Doctoral presentada per Tíscar Graells per optar al títol de Doctora amb Menció Europea Internacional dins el Programa de Doctorat en Microbiologia per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Doctoral thesis presented by Tíscar Graells for the Degree of Doctor of Philosophy with International European Mention inside the Microbiology Program at Universitat Autònoma de Barcelona.

*A la meva família, que sempre m'ha fet costat,
encara que moltes vegades sense entendre el que faig.*

En especial, a la iaia Rosa i a la iaia Magda.

Índex

Índex.....	5
Índex d'imatges	7
Índex de taules.....	9
Abbreviations / Abreviatures:.....	10
Resum // Summary	12
1. Introducció	14
1.1. El camp de la microbiologia	14
1.2. Descobriment de la <i>Legionella</i>	14
1.3. Actualitat.....	16
1.3.1. Epidemiologia.....	16
2. Legionella	19
2.1. Descripció general i morfologia.....	19
2.2. Taxonomia.....	20
2.3. Característiques fisiològiques i metabolisme.....	21
2.4. Genoma	22
2.5. Ecologia	24
2.5.1. Amebes.....	24
2.5.2. Biofilms.....	27
2.5.3. Temperatura.....	29
2.5.4. Relació amb altres bacteris	30
2.5.5. VBNC (Cèl·lules viables però no cultivables)	31
2.5.6. Cicle cel·lular	31
2.5.7. Sistemes de distribució d'aigua artificials	34
2.6. Patogenicitat i factors de virulència.....	35
2.6.1. T4BSS.....	35
2.6.2. Envolt cel·lular	35
2.6.3. Pilis i flagel.....	38
2.7. Manifestacions Clíniques	39
2.7.1. Mecanismes de transmissió	39
2.7.2. Formes clíniques i factors de risc:	40
2.7.3. Diagnòstic.....	41
2.7.4. Sensibilitat antibiòtica natural	43

2.7.5.	Tractament.....	44
2.7.6.	Tipificació molecular	45
2.8.	Prevenió.....	47
2.8.1.	Control d'instal·lacions.....	51
2.8.2.	Bases microbiològiques de la resistència de <i>Legionella</i> als mètodes de desinfecció.....	52
2.8.3.	Estudi de brots	53
2.9.	Immunitat.....	54
2.10.	Estudis metagenòmics.....	56
3.	Justificació de la tesi	57
4.	Objectius	58
4.1.	Objectius específics article I: <i>Legionella pneumophila</i> recurrently isolated in a Spanish hospital: Two years of antimicrobial resistance surveillance	58
4.2.	Objectius específics article II: The all-intracellular order <i>Legionellales</i> is unexpectedly diverse, globally distributed and lowly abundant.....	59
5.	Resultats	60
5.1.	Article I: <i>Legionella pneumophila</i> recurrently isolated in a Spanish hospital: Two years of antimicrobial resistance surveillance.....	60
5.2.	Article II: The all-intracellular order <i>Legionellales</i> is unexpectedly diverse, globally distributed and lowly abundant.....	61
6.	Discussió general	62
7.	Conclusions	69
7.1.	Conclusions article I: <i>Legionella pneumophila</i> recurrently isolated in a Spanish hospital: Two years of antimicrobial resistance surveillance	69
7.2.	Conclusions article II: The all-intracellular order <i>Legionellales</i> is unexpectedly diverse, globally distributed and lowly abundant	71
8.	Agraïments.....	72
9.	Bibliografia.....	75
10.	Informació addicional.....	84
10.1.	Beques, pòsters i assistència a congressos	84
10.2.	Articles no inclosos a la tesi.....	85
11.	Annex I: Articles.....	86

Índex d'imatges

Imatge 1: Hotel Bellevue-Stratford, lloc del brot al 1976. Font: Wikimedia.....	15
Imatge 2: A) Distribució en percentatge per franges d'edat dels casos de LD a la UE/EEA, Espanya i Suècia l'any 2017. B) Distribució en percentatge per sexe a la UE/EEA, Espanya i Suècia dels casos de 2017. C) Nombre de casos de LD a la UE/EEA, Espanya i Suècia en el període 2005-2017. D) Distribució en percentatge dels casos per lloc de contracció de la infecció al 2017. Font: Disease data from ECDC Surveillance Atlas: Legionnaires' Disease.....	17
Imatge 3: Nombre de casos de LD per 100.000 habitants. Dades de l'any 2017. Font: Disease data from ECDC Surveillance Atlas: Legionnaires' Disease.....	18
Imatge 4: Nombre de casos de legionel·losi a cada regió sanitària per 100.000 habitants. Dades provisionals de l'any 2017. Font: Subdirecció General de Vigilància i Resposta a Emergències de Salut Pública (SGVRESP).....	18
Imatge 5: Tinció de Gram d'una colònia de <i>Legionella pneumophila</i> (Microscopi Olympus BX41 , Objectiu 100X, oli d'immersió), es pot veure la tinció dèbil dels bacteris, la forma bacil·lar i les formes filamentoses. Crèdit: Tíscar Graells, 19 de maig de 2015, Catlab Centre Analítiques AIE.....	19
Imatge 6: Colònies de <i>Legionella pneumophila</i> , després d'una setmana d'incubació, en agar BCYEa. Crèdit: Tíscar Graells, 31 de maig de 2015, Catlab Centre Analítiques AIE.....	19
Imatge 7: Extreta de [1] (Rowbotham,1980). Trofozoït de <i>Acanthamoeba castellanii</i> infectada per <i>Legionella pneumophila</i> Oxford-1. Tinció modificada de Giménez.....	25
Imatge 8: (A) Ruta metabòlica per defecte a l'interior d'amebes i (B) <i>Legionella pneumophila</i> modula la ruta endocítica per establir un nínxol replicatiu dins la vacuola. Font: Tíscar Graells adaptat de [2].....	26
Imatge 9: Extret de [3] (Fouque, 2012); <u>Dreta:</u> <i>Acanthamoeba</i> spp. Microscopi electrònic de Transmissió: (A) Trofozoït i (C) Cist. Microscopi electrònic d'escaneig (B) Cist. <u>Esquerra:</u> <i>Vermamoeba (Hartmannella)</i> spp. Microscopi electrònic de Transmissió (A) Trofozoït i (C) Cist. Microscopi electrònic d'escaneig (B) Cist.....	27
Imatge 10: Heterogeneïtat d'un biofilm: Bacteris envoltats d'una matriu extracel·lular polisacàrida amb diferents gradients de nutrients i ampliació de la composició interior de la matriu extracel·lular. Font: Extret i adaptat de [4].....	28
Imatge 11: Passos necessaris per a la formació i maduració d'un biofilm. 1) Contacte i unió reversible al substrat. 2) Unió irreversible. 3) Creixement i maduració inicial 4) Maduració i 5) Alliberament i dispersió parcial. Font: Extret de [5].....	28
Imatge 12: Temps de reducció decimal de <i>Legionella pneumophila</i> sg 1 a diferents temperatures (D = minuts necessaris per reduir el 90% de la població). Font: Bartram,WHO,2007.....	29
Imatge 13: Esquema de l'efecte de la temperatura en la viabilitat de <i>Legionella</i> . Font: Tíscar Graells.....	29
Imatge 14: Esquema dels diferents estadis de <i>Legionella pneumophila</i> durant el seu cicle cel·lular. (1) Entrada a la cèl·lula hoste (2) Multiplicació dins la LCV, evasió de la fusió fagosoma-lisosoma (3) Condicions desfavorables i manca de nutrients condueixen al canvi de fase, expressió de gens de virulència (4) Bacteris lisen la vacuola i l'hoste i són alliberats al medi extracel·lular (5) MIF de <i>Legionella</i> a l'ambienten forma lliure (6) Pot acabar formant part d'un biofilm (7) <i>Legionella pneumophila</i> en cultiu líquid també té un cicle bifàsic amb formes semblants a les que es poden observar al medi natural. Font: Adaptat de [6].....	32

Imatge 15: Metabolisme esquematitzat de <i>Legionella pneumophila</i> dins els compartiments cel·lulars. Durant la infecció es forma un compartiment permissiu per a la replicació o LCV. Des d'aquí el bacteri té accés als nutrients necessaris per a la replicació, especialment aminoàcids, gràcies a transportadors cel·lulars com PthA/PthJ, AnkB o FeoAB. Font: Adaptat i simplificat de [7].....	33
Imatge 16: Esquema model de la resposta de diferenciació de <i>Legionella pneumophila</i> . Font: Adaptat i simplificat de [6].....	34
Imatge 17: Esquema de la paret bacteriana de <i>Legionella pneumophila</i> i detall del LPS. Font: Adaptat de [8].....	36
Imatge 18: Circuit de transmissió de <i>Legionella</i> . Font: Tíscar Graells, adaptat de [9].....	39
Imatge 19: ICT utilitzada per la detecció de <i>Legionella</i> en orina.....	42
Imatge 20: Procediment per a realitzar un PFGE, extret de (PulseNet, CDC) i parcialment traduït.....	46
Imatge 21: Resposta innata en un macròfag infectat per <i>Legionella pneumophila</i> . Font: Tíscar Graells, adaptat i simplificat de [10].....	55
Imatge 22: Logo del projecte Poseidon dins el marc europeu Horizon 2020 i de les 6 institucions que participaven en la recerca.....	57

Índex de taules

Taula 1: Espècies del gènere <i>Legionella</i> , serogrupos i casos clínics associats.....	21
Taula 2: Característiques d'alguns dels marcadors moleculars més utilitzats, adaptat de SEIMC (procediments de microbiologia).....	45
Taula 3: Criteris per a la identificació de patrons de PFGE, adaptada de [11].....	47
Taula 4: Àmbit d'aplicació del Real Decret 865/2003.....	50
Taula 5: Principals avantatges i desavantatges dels mètodes de desinfecció més comuns front <i>Legionella</i> . Font: Tíscar Graells, adaptat de (Bartram,WHO,2007).....	51
Taula 6: Mesures correctores a aplicar segons els resultats del cultiu microbiològic (ISO 11731:2017) de <i>Legionella</i>	52

Abbreviations / Abreviatures:

ARB: Amoebae-resistant bacteria / Bacteris resistents a amebes

BCYE α : Buffered Charcoal Yeast Extract with α -ketoglutarate

CDC: Centers for Disease Control and prevention

CFU: Colony Forming Unit / Unitat formadora de colònia

COPD: Chronic Obstructive Pulmonary Disease / Malaltia pulmonar obstructive crònica

DNA: Deoxyribonucleic acid / Àcid desoxiribonucleic

Dot/icm: Defect in organelle trafficking / intracellular multiplication

ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control

ELDSNet: European Legionnaires' Disease Surveillance Network

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

EU/EEA: European Union, European Economic Area / Unió europea, Marc econòmic europeu

EWGLI: European Working Group for *Legionella* Infections

FLA: Free-living amoebae / Amebes de vida lliure

HGT: Horizontal gene transfer / Transferència horitzontal de gens

IFI: Indirect immunofluorescence / Immunofluorescència indirecta

IFN γ : Interferon gamma/ Interferó gamma

LD: Legionnaires' Disease / Malaltia del legionari o legionel·losi

LCV: Legionella-containing vacuole / Vacuola que conté Legionella

LPS: lipopolysaccharide/ lipopolisacàrid

MALDI-ToF: Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization -Time of Flight

MIC: Minimum Inhibitory Concentration / Concentració Mínima Inhibitòria

MIF: Mature Infective Form / Estadi infectiu madur

OTU: Operational Taxonomic Unit / Unitat taxonòmica operativa

PCR: Polymerase Chain Reaction / Reacció en cadena de la polimerasa

PFGE: Pulse-Field Gel Electrophoresis / Electroforesi de camp pulsant

ppGpp: Guanosine tetraphosphate / guanosine tetrafosfat

RNA: Ribonucleic acid / Àcid ribonucleic

RPF: Replicative form / forma replicativa

SBT: Sequence-Based Typing

sg: serogroup / serogrup

ST: Sequence Type / Seqüència tipus

T2SS: Type II secretion system / Sistema de secreció tipus II

T4BSS: Type IVB secretion system / Sistema de secreció tipus IVB

WHO: World Health Organization / Organització Mundial de la Salut

Resum // Summary

El gènere *Legionella* va ser descobert el 1976 a arran d'un brot de pneumònia per *Legionella pneumophila* a Philadelphia (Estats Units) que va causar més d'una vintena de morts. Des d'aleshores, s'han publicat nombrosos estudis per conèixer més d'aquest peculiar bacteri.

El gènere *Legionella* és un gènere present a la natura i amb un reservori principalment relacionat amb el medi aquàtic. S'estima que les seves concentracions a la natura són baixes però poden augmentar en sistemes d'aigua artificials.

A l'inici de la dècada dels 1980, Rowbotham va veure que el gènere era capaç de multiplicar-se intracel·lularment a l'interior de protozous. A més, els protozous podien fer de reservori i ajudar a la disseminació de la malaltia. I així, va proposar una nova idea al camp de la microbiologia: bacteris com el gènere *Legionella* podien parasitar organismes unicel·lulars com les amebes i utilitzar els mateixos processos i estratègies per infectar els macròfags humans. El mecanisme de transmissió inclou la inhalació d'aerosols que continguin el bacteri i que un cop arriben als alvèols pulmonars, poden causar legionel·losi, sobretot en determinats grups de risc en la població.

Amb l'era de la genòmica, aquest concepte s'ha estudiat en profunditat i s'ha vist que no només utilitzen els mateixos processos per infectar humans, sinó que manipulen les funcions de l'hoste amb proteïnes "impostores" per poder replicar-se i créixer en detriment de l'hoste. Així, utilitzen proteïnes amb motius eucariotes molt similars a les de l'hoste per dur a terme les seves funcions.

Però la vida del gènere *Legionella* encara pot ser molt més complicada. A part de ser un bacteri intracel·lular, pot formar part de complexos biofilms o passar a un estat més resistent al qual anomenem VBNC. Així doncs, el gènere té múltiples estratègies per protegir-se i per sobreviure a la natura i, conseqüentment, es poden colonitzar els sistemes d'aigua artificials.

Per evitar la disseminació i les elevades concentracions de legionel·la en aquests sistemes, s'han descrit una sèrie de mesures preventives de control d'instal·lacions i de desinfecció en continu de l'aigua. La concentració baixa d'aquests bacteris a l'aigua és la principal mesura preventiva per evitar possibles brots i disseminació de la legionel·losi.

Malgrat aquestes mesures, les colonitzacions persistents en edificis d'alt risc encara són un problema de Salut Pública degut a la complexa biologia del microorganisme. L'estudi en profunditat d'aquests bacteris intracel·lulars és clau per entendre la seva complexa ecologia i per aplicar estratègies efectives per una bona prevenció.

Legionella genus was discovered after a pneumonia outbreak in Philadelphia (United States) in 1976 that caused up to twenty deaths. Since then, many research studies have been conducted to clarify different aspects of these peculiar bacteria.

Legionella spp. are present naturally in different environmental ecosystems with special mention to aquatic environments. Their concentration in those habitats are estimated to be low but this may change when they are in more comfortable environmental conditions such as in man-made water systems.

In the early 1980s, Rowbotham discovered that *Legionella* spp is capable of multiplying intracellularly inside protozoa. Moreover, they act as an environmental reservoir and can help to disseminate these bacteria. This discovery led him to a new perspective in Microbiology: *Legionella* genus can parasite unicellular eukaryotes like FLA and use the same processes and strategies to infect human macrophages. Aerosols containing these bacteria are responsible for the transmission of the disease and they cause LD when they arrive to the lung alveoli, especially in immunocompromised people.

These concepts have been studied since then and they have been amplified using genomic techniques. *Legionella* spp not only they use the same processes for infecting humans but also, they can hijack important host functions and cell pathways using their “eukaryotic-like” proteins or proteins with eukaryotic domains. Those proteins mimicry the ones present in host cell pathways to manipulate host functions to the pathogen’s advantage.

However, *Legionella* life cycle can be even more complicated. Apart from being intracellular bacteria, they can be part of complex biofilms or change into a more resistant form known as VBNC. These bacteria have several and different strategies to protect them and to survive in nature and, consequently, in colonized artificial water systems.

To avoid high concentrations of *Legionella* in water systems and to avoid LD dissemination, many prevention strategies and disinfection methods have been described and regulated by law. Maintenance of low concentrations of *Legionella* in water is the key to prevent outbreaks and LD cases.

Despite all these measures, there are buildings permanently colonized by *Legionella* spp which are still a concern for Public Health authorities. The need for studying these bacteria is important to have a broader picture and to understand their complex ecology and, ultimately, to apply effective prevention strategies.

1. Introducció

1.1. El camp de la microbiologia

Els bacteris estan a tot arreu, però, durant milers d'anys van ser invisibles per a l'ésser humà. Podríem dir que la seva existència per a nosaltres és molt recent i que eren inexistents al nostre coneixement fins que l'holandès Antonie van Leeuwenhoek va obrir la porta a la microbiologia a mitjans del segle XVII. Va ser ell qui va agafar mostres d'aigua del llac Berkelse Mere, prop del seu Delft natal. Observant una gota d'aigua, amb un microscopi fet per ell mateix, va veure per primer cop el que va anomenar petites criatures ballarines. Aviat, va veure que eren a tot arreu allà on mirava. Aquestes criatures ballarines és el que avui en dia coneixem com a microorganismes.

A mitjans del segle XVIII, Carl Linnaeus va classificar aquests microorganismes al gènere *Coax* (sense forma) i al fílum *Vermes* (forma de cuc). Un segle després, a mitjans del segle XIX, la microbiologia tornà a agafar empenta gràcies als importants microbiòlegs Louis Pasteur i Robert Koch. Era l'inici del camp com el coneixem a dia d'avui.

La gran majoria de bacteris són peces molt importants perquè el món estigui en equilibri i funcioni bé. En el cas de l'ésser humà, aquests simbiotes que viuen i habiten amb nosaltres mantenen un hàbitat i un equilibri impedit que patògens que poden ser una amenaça per la salut puguin arribar i colonitzar-nos. Molts dels bacteris que ens envolten ens són innocus o beneficiosos i s'estudien amb el nom de microbioma. Ara bé, no només és important quins estan amb nosaltres i on, sinó també, amb quina quantitat. L'equilibri si no es manté o s'altera dona lloc a que els bacteris que habiten amb nosaltres puguin passar a ser oportunistes causant malaltia. Malgrat tot, encara molta gent avui en dia associa la microbiologia només a la microbiologia clínica o mèdica. És a dir, l'estudi de patògens i bacteris que causen malaltia. Tot i no ser els més abundants, els patògens són dels millors estudiats per les conseqüències que poden causar dins la societat des d'infeccions i malalties greus fins la mort.

Aquesta tesi va dedicada a un d'aquests patògens, un d'aquest anomenats "fastidiosos" i difícils d'aïllar, la *Legionella*.

1.2. Descobriment de la *Legionella*

La història de la *Legionella* comença a la 58^a Convenció anual de la legió Americana que va tenir lloc a l'Hotel Bellevue-Stratford a Philadelphia entre el 21 i el 24 de juliol del 1976. Poc després del final de la convenció, més d'un centenar de persones, la majoria assistents, van començar a



Imatge 1: Hotel Bellevue-Stratford, lloc del brot al 1976. Font: Wikimedia

tenir febre alta, tos, mal de pit i cansament i van ser diagnosticats amb pneumònia. Alguns van morir dies després i en total van arribar a 34 víctimes mortals.

En aquell moment, la causa d'aquest brot era un misteri. Tot i que científics del CDC treballaven per determinar què havia causat el brot, no trobaven l'agent infeccios ni la font de transmissió. David Fraser, cap de l'àrea de patògens especials al CDC, conduïa la investigació. Es van analitzar tant mostres clíniques com mostres ambientals recollides a l'hotel i es van incloure els patògens respiratoris causants de la febre Q o la psitacosis, però tot va donar resultat negatiu. David Fraser, 5 mesos després, al desembre de 1976, va escriure l'informe final conclouent que tot i que semblava una malaltia infecciosa cap dels estudis microbiològics havia donat

un resultat positiu. Un mes més tard, dos científics que treballaven amb *Rickettsia* al CDC, Joseph McDade i George Carter Shepard, van resoldre el misteri. McDade va observar clústers de bacteris al teixit pulmonar de conillets d'índia inoculats amb mostres de pacients del brot, clústers que no havia vist prèviament. En aquell moment, utilitzaven cultius amb antibiòtics per evitar contaminació amb bacteris comensals i va pensar que podria tractar-se d'una contaminació. Però McDade va decidir repetir l'experiment sense utilitzar antibiòtics per permetre que tot el que estigués a la mostra creixés lliurement i sense impediments. I un altre cop va observar els clústers de bacteris amb forma de bacil que havia vist prèviament. Aleshores, va demanar sèrum dels pacients del brot per provar si havia reacció antígen-anticòs. Aquesta reacció va ser positiva i juntament amb Shepard, van decidir fer tests a cegues entre bacteris i sèrum. Aquestes proves van resultar conclouents per anunciar el 18 de gener de 1977 que l'agent causal del brot de l'hotel Bellevue-Stratford era un bacteri, batejat com a: *Legionella pneumophila* [12]. Poc després de l'anunci, es va comprovar que *Legionella* havia causat prèviament altres brots esporàdics sense causa definida: al 1942 a Fort Bragg, Carolina del Nord, on Hugh Tatlock aïllà de les mostres clíniques alguns bacteris semblants a les rickettsies i que

després es va identificar com a *Legionella micdadei* [13]; al 1965 a l'hospital St Elizabeth's a Washington DC i al 1968 al Departament de Salut d'Oakland a Pontiac, Michigan) [14].

A partir d'aquí el gènere ha estat en el punt de mira, s'han descrit més espècies i el seu estudi ha determinat que són bacteris amb reservori al medi aquàtic, que normalment es troben a l'interior d'amebes i protozoous als quals infecten [1,7] o associats a biofilms [15,16].

1.3. Actualitat

La LD és considerada una malaltia emergent i de distribució mundial ja que la seva transmissió està estretament relacionada amb les noves instal·lacions, tecnologia i nivell de vida desenvolupades per l'ésser humà. També és malaltia de declaració obligatòria (MDO) a la major part dels països amb sistemes de vigilància epidemiològica. És probable que la magnitud de la legionel·losi estigui infravalorada a nivell mundial degut a una insuficient accessibilitat a les proves de diagnòstic i la poca exhaustivitat dels sistemes de vigilància, quan hi són. La incidència global és difícil de quantificar i sol ser més elevada en països desenvolupats on els recursos per al seu diagnòstic són més accessibles. Per aquest motiu l'estimació real de la seva incidència és complicada.

1.3.1. Epidemiologia

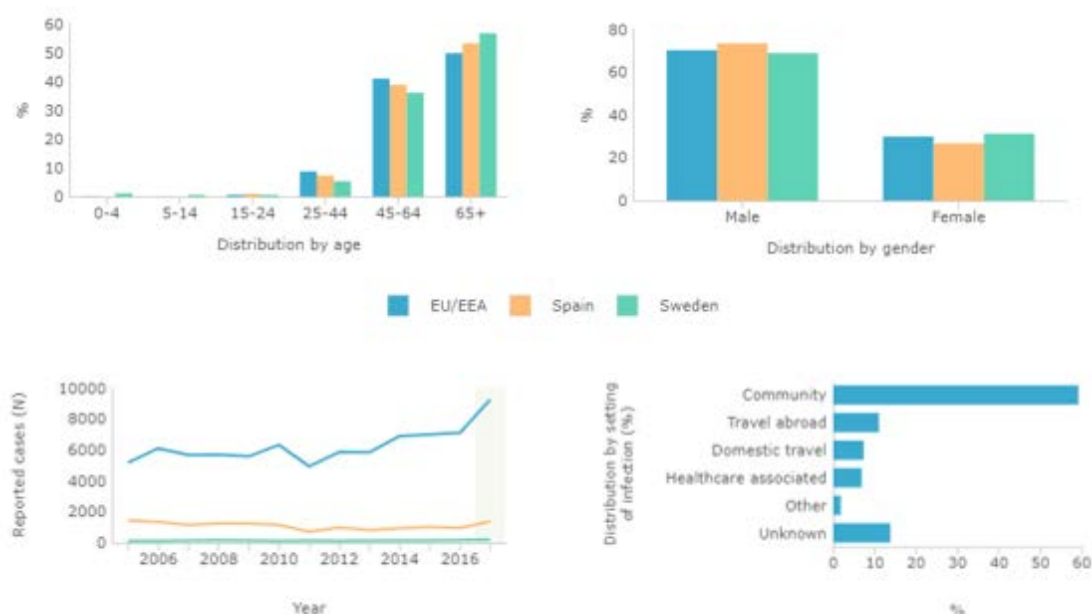
La tendència dels últims anys és un notable increment dels casos clínics per *Legionella*, tant a nivell regional com a nivell europeu, malgrat que la mortalitat associada s'ha disminuït. Aquest fet podria estar causat, entre altres coses, per la millora en les tècniques diagnòstiques i per la reducció del temps per a començar el tractament adequat.

La incidència de pneumònia per LD és variable i s'ha vist influenciada per l'àrea geogràfica, l'època de l'any, més casos a finals d'estiu o tardor; i el grup de pacients afectat. Les persones afectades solen tenir més de 45 anys (Imatge 2) i moltes vegades amb unes condicions de base que els fan més vulnerables a la infecció per *Legionella*: immunodeprimits, pacients amb COPD, diabètics, fumadors, alcohòlics, edat molt avançada. A més, hi ha parcialitat depenent del sexe: els casos de pacients homes poden arribar a més del doble que els de dones (Imatge 2). A part de a la comunitat, per les característiques dels pacients als centres sanitaris, les pneumònies per *Legionella* poden adquirir-se en un hospital, anomenant-se LD nosocomial o LD adquirida a l'hospital. També grans edificis, com hotels, són potencials fonts de transmissió del bacteri i les LD diagnosticades en aquets casos es coneixen com a LD del viatger (Imatge 2). Els casos diagnosticats s'estudien a escala epidemiològica, es cerca la possible font de transmissió i es

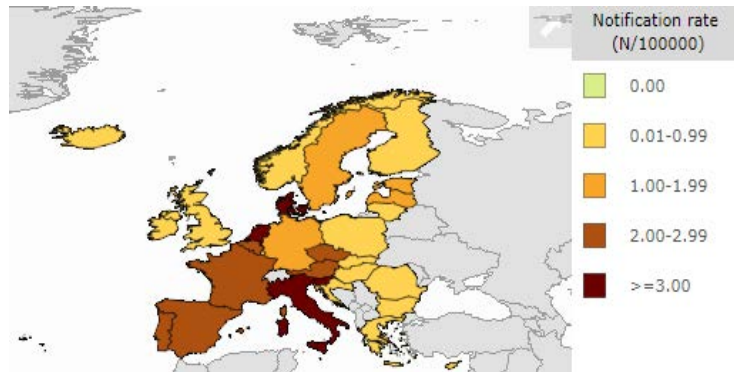
poden agrupar en forma de brot (diferents casos al mateix lloc i temps), casos agrupats (si no coincideixen en el temps) i casos esporàdics (sense coincidir en temps ni espai).

A la majoria de països desenvolupats i amb una xarxa de vigilància epidemiològica és una malaltia de declaració obligatòria. A Espanya ho és des del 1995 (Real Decreto 2210/1995 de 28 de desembre) i els casos identificats, incloent-hi LD i febre de Pontiac, es notifiquen al Centre Nacional d'Epidemiologia a través de la Red Nacional de Vigilància Epidemiològica (RENAVE). A més a més, en l'àmbit europeu, 31 països de la EU/EEA notifiquen els casos al ECDC i les dades són publicades a ELDSNet, fet que ajuda a identificar casos relacionats amb LD del viatger. Igualment, 11 països fora d'aquest marc també tenen accés a aquesta eina (Andorra, Austràlia, Canadà, Israel, República de Corea, Sud-Àfrica, Suïssa, Tailàndia, Turquia, Emirats Àrabs Units, i els Estats Units). S'ha de remarcar que els criteris diagnòstics del ECDC i de RENAVE són diferents. El ECDC només té en compte les LD i no la febre de Pontiac, la qual cosa pot fer variar el nombre de casos i declaracions.

Segons dades del ECDC-ELDSNet l'any 2017 els casos de LD a la EU/EEA van ser 9.238 amb una incidència de 1.79 casos per 100.000 habitants (Imatges 2 i 3). El nombre de morts va arribar als 574 i l'índex de fatalitat al 8.23%. En el cas d'Espanya van ser 1363 casos amb una incidència de 2.93 casos per 100.000 habitants i 83 morts. En el cas de Suècia els casos van ser 189, la incidència de 1.89 casos per 100.000 habitants, 28 morts i índex de fatalitat de 16.28%.



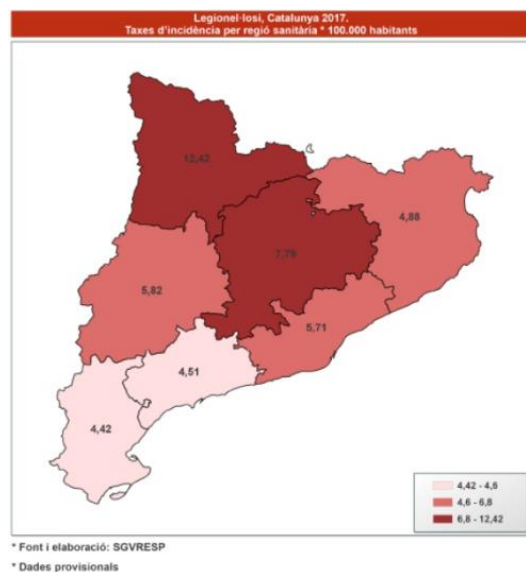
Imatge 2: A) Distribució en percentatge per franges d'edat dels casos de LD a la UE/EEA, Espanya i Suècia l'any 2017. B) Distribució en percentatge per sexe a la UE/EEA, Espanya i Suècia dels casos de 2017. C) Nombre de casos de LD a la UE/EEA, Espanya i Suècia en el període 2005-2017. D) Distribució en percentatge dels casos per lloc de contracció de la infecció al 2017. Font: Disease data from ECDC Surveillance Atlas: Legionnaires' Disease.



Imatge 3: Nombre de casos de LD per 100.000 habitants. Dades de l'any 2017. Font: Disease data from ECDC Surveillance Atlas: Legionnaires' Disease.

La incidència de legionel·losi a Catalunya en els últims 5 anys ha estat de normalitat, amb una tendència estable. L'any 2014 la incidència va ser de 4,39, al 2015 de 3,68 i al 2016 de 4,39 per 100.000 habitants. (Butlletí Epidemiològic de Catalunya, BEC, volum 38 número 1 Anual 2017 i volum 39 número 2, Febrer 2018)

Així mateix, els casos de majors de 60 anys van suposar el 62 % i la raó home/dona va ser de 2,7 indicant un clar predomini de casos d'homes (Butlletí Epidemiològic de Catalunya, BEC, volum 39 número 2, Febrer 2018).



Imatge 4: Nombre de casos de legionel·losi a cada regió sanitària per 100.000 habitants. Dades provisionals de l'any 2017. Font: Subdirecció General de Vigilància i Resposta a Emergències de Salut Pública (SGVRESP)

2. Legionella

2.1. Descripció general i morfologia

Legionella és un gènere format per un grup de bacteris pleomòrfics amb predomini de la forma bacil·lar, amb 0.3 - 0.9 µm de diàmetre i 2- 3 µm de llargada. No obstant, la seva mida pot ser molt variable arribant a més de 20 µm de llargada depenent de les condicions i quan es troben en cultiu *in vitro* [9]. Tot i que estructuralment es consideren bacils gramnegatius, *Legionella* s'observa amb dificultat amb la tinció de Gram. La tècnica de Giménez, utilitzada per rickètsies, és tan ràpida com la tinció de Gram i tenyeix el microorganisme de forma més efectiva [17]. No formen espores, no són capsulats i majoritàriament són mòbils amb flagel(s) polaritzat(s), exceptuant algunes espècies com *Legionella longbeachae* i *Legionella oakridgensis* [18]. Només algunes espècies presenten un sistema de quimiotaxi com *Legionella longbeachae*, *Legionella parisiensis* i *Legionella bozemanii* [18]. No són àcid-alcohol resistents a excepció de *Legionella micdadei* que ho és lleugerament. Són bacteris intracel·lulars facultatius estrictament aerobis i el seu creixement al laboratori es pot veure afavorit en una atmosfera amb un 3% de diòxid de carboni (CO₂). Algunes espècies poden presentar fluorescència al ser exposades a longituds d'ona prop dels 360 nm.



Imatge 5: Tinció de Gram d'una colònia de *Legionella pneumophila* (Microscopi Olympus BX41, Objectiu 100X, oli d'immersió), es pot veure la tinció dèbil dels bacteris, la forma bacil·lar i les formes filamentoses. Crèdit: Tíscar Graells, 19 de maig de 2015, Catlab Centre Analítiques AIE.



Legionella creix al laboratori en agar BCYEα i les colònies tenen un color blanc-grisós, marges llisos i amb aspecte de vidre esmerilat, que poden ser visibles després de 3-10 dies d'incubació a 35-37 °C en condicions aeròbies.

Imatge 6: Colònies de *Legionella pneumophila*, després d'una setmana d'incubació, en agar BCYEα. Crèdit: Tíscar Graells, 31 de maig de 2015, Catlab Centre Analítiques AIE.

2.2. Taxonomia

Legionella està classificada dins el súper-regne Procariota, domini Bacteria, fílum Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria, ordre *Legionellales*, família *Legionellaceae* i gènere *Legionella*.

L'ordre *Legionellales* conté només una altra família: la família *Coxiellaceae*. Aquest ordre està format per bacteris intracel·lulars i com a novetat evolutiva característica té la presència del sistema de secreció tipus IVB (T4BSS) anomenat Dot/icm (Defect in organelle trafficking / intracellular multiplication) en tots els organismes d'aquest taxó. El sistema Dot/icm introdueix dins la cèl·lula hoste una gran quantitat de proteïnes efectores que modifiquen el comportament de l'hoste per evitar la unió fagosoma-lisosoma i afavorir la multiplicació bacteriana dins dels compartiments intracel·lulars [19,20].

La família *Coxiellaceae* conté diferents gèneres, molts dels quals no són patògens per als humans. Per això no és tan coneguda en el món clínic i inclou els gèneres: *Coxiella*, *Aquicella*, *Diplorickettsia*, *Rickettsiella*, *Candidatus Berkiella* i *Candidatus Cochliophilus*. L'agent patògen més conegut d'aquesta família és *Coxiella burnetii*, agent causal de la febre Q [21]. Recentment, un altre membre d'aquesta família *Diplorickettsia massiliensis* també s'ha descrit com a patògen per a l'ésser humà [22].

Dins la família *Legionellaceae* s'han descrit, històricament, tres gèneres: *Tatlockia*, *Fluoribacter* i *Legionella* [23]. Malgrat aquesta proposta, aquesta classificació no va ser utilitzada pels microbiòlegs per falta de grans diferències fenotípiques entre elles. A més, s'ha vist que la família *Legionellaceae* és un grup monofilètic, amb *Tatlockia* i *Fluoribacter* com a grup parafilètic de *Legionella*, i s'accepta, per tant, *Legionella* com a únic gènere dins la família [24].

Actualment, s'han descrit més de 70 espècies al gènere *Legionella*. Però és un nombre en constant augment, la última descrita va ser a l'abril d'aquest mateix any, 2018, *Legionella indianapolisensis* [25]. Dins una mateixa espècie, els antígens O del LPS són els que diferencien entre serogrupos. Però, només un terç d'elles (24) s'han vist relacionades amb casos clínics i patologia a l'ésser humà.

L'espècie més patògena a tot el món i amb el nombre de casos identificats més gran és actualment *Legionella pneumophila* amb gairebé un 90% [26,27]. Seguida de *Legionella longbeachae*, que a Austràlia i Nova Zelanda pot arribar al 30% dels casos [9]. A més a més, com a excepció peculiar del gènere, l'espècie 'Candidatus *Legionella polyplacis*' descrita l'any passat [28] presenta moltes diferències respecte a les *Legionella* descrites fins ara: (i) és intracel·lular

obligada, (ii) té una reducció genòmica important i (iii) és un simbiot del gènere de paràsits *Polyplax* spp.

Espècie	Serogrups	Casos clínics	Espècie	Serogrups	Casos clínics
<i>L. adelaidensis</i>	1	No	<i>L. lytica</i>	1	No
<i>L. anisa</i>	1	Sí	<i>L. maceachernii</i>	1	Sí
<i>L. beliardensis</i>	1	No	<i>L. massiliensis</i>	1	No
<i>L. birminghamensis</i>	1	Sí	<i>L. micdadei</i>	1	Sí
<i>L. bozemanæ</i>	2	Sí	<i>L. monrovica</i>	1	No
<i>L. brunensis</i>	1	No	<i>L. moravica</i>	1	No
<i>L. busanensis</i>	1	No	<i>L. nagasakiensis</i>	1	Sí
<i>L. cardiaca</i>	1	Sí	<i>L. nautarum</i>	1	No
<i>L. cherrii</i>	1	No	<i>L. norrlandica</i>	1	No
<i>L. cincinnatiensis</i>	1	Sí	<i>L. oakridgensis</i>	1	Sí
<i>L. clemsonensis</i>	1	No	<i>L. parisiensis</i>	1	Sí
<i>L. donaldsonii</i>	1	No	<i>L. pittsburghensis</i>	1	No
<i>L. drancourtii</i>	1	No	<i>L. pneumophila</i>	16	Sí
<i>L. dresdenensis</i>	1	No	<i>L. quateirensis</i>	1	No
<i>L. drozanskii</i>	1	No	<i>L. quinlivanii</i>	2	No
<i>L. dumoffii</i>	1	Sí	<i>L. rowbothamii</i>	1	No
<i>L. erythra</i>	2	Sí	<i>L. rubrilucens</i>	1	No
<i>L. fairfieldensis</i>	1	No	<i>L. sainthelensi</i>	2	Sí
<i>L. fallonii</i>	1	No	<i>L. santicrucis</i>	1	No
<i>L. feeleii</i>	2	Sí	<i>L. saoudiensis</i>	1	No
<i>L. geestiana</i>	1	No	<i>L. shakespearei</i>	1	No
<i>L. gormanii</i>	1	Sí	<i>L. spiritensis</i>	2	No
<i>L. gratiana</i>	1	No	<i>L. steelei</i>	1	Sí
<i>L. gresilensis</i>	1	No	<i>L. steigerwaltii</i>	1	No
<i>L. hackeliae</i>	2	Sí	<i>L. taurinensis</i>	1	No
<i>L. impletisoli</i>	1	No	<i>L. thermalis</i>	1	No
<i>L. indianapolisensis</i>	1	Sí	<i>L. tucsonensis</i>	1	Sí
<i>L. israelensis</i>	1	No	<i>L. tunisiensis</i>	1	No
<i>L. jamestowniensis</i>	1	No	<i>L. wadsworthii</i>	1	Sí
<i>L. jordani</i>	1	Sí	<i>L. waltersii</i>	1	No
<i>L. lansingiensis</i>	1	Sí	<i>L. worsleiensis</i>	1	No
<i>L. londiniensis</i>	2	No	<i>L. yabuuchiae</i>	1	No
<i>L. longbeachae</i>	2	Sí			

Taula 1: Espècies del gènere *Legionella*, serogrups i casos clínics associats

2.3. Característiques fisiològiques i metabolisme

Els bacteris del gènere *Legionella* són catalasa positiva, oxidasa variable, ureasa negativa i reducció de nitrats negativa. Molts són productors de β -lactamases [29–31]. Algunes espècies poden sintetitzar cel·lulosa, important component en alguns biofilms bacterians [32]. Són quimioorganotròfiques, poc sacarolítiques i poc actives metabòlicament. Per aquest motiu les proves bioquímiques utilitzades generalment no són útils per a la seva identificació. La seva principal font d'energia prové de la utilització d'aminoàcids que són catabolitzats en el Cicle de Krebs. Necessita com a aminoàcids essencials arginina, cisteïna, metionina, serina, treonina,

leucina, isoleucina i valina [33]. No poden utilitzar la glucosa ni altres glúcids ni per via oxidativa ni per via fermentativa (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2005). Tenen vies que codifiquen per al metabolisme de glúcids (via Entner-Doudoroff, via Embden-Meyerhof-Parnas, via parcial de les pentoses fosfat) però la seva utilització per al creixement no està clara [6,7,34]. El creixement en medi sòlid només es dona en un estret rang de pH (6.3-7.3), la temperatura òptima està al voltant dels 35-37 °C i en condicions aeròbies o amb una concentració de 2 a 5% de diòxid de carboni [1]. Aquests requeriments especials fan que no es puguin aïllar en medis de cultius convencionals. Com a font d'aminoàcids s'utilitza l'extracte de llevat en medis de cultiu. A més, un tret distintiu pel seu creixement i primo aïllament en medis de cultiu és la necessitat de L-cisteïna [24], excepte *Legionella oakridgensis* i *Legionella spiritensis* [24], i les sals fèrriques estimulen el creixement. El medi per aïllar *Legionella* també té carbó actiu, el que li dona aquest color negre tan característic, per detoxificar el medi de radicals oxidatius i evitar l'oxidació de la L-cisteïna, i α -cetoglutarat per eliminar del medi els radicals lliures d'oxigen [24] i perquè aquest cetoàcid disminueix la fase lag [35]. BCYE α - Buffered Charcoal Yeast Extract agar supplemented with α -ketoglutarate - per les seves inicials en anglès, és el medi recomanat i que compleix els requeriments d'aquest gènere exigent. Tot i així, el seu creixement és lent.

Algunes soques no s'han pogut aïllar en medi de cultiu i s'han caracteritzat amb el co-cultiu amb els seus hostes. Aquestes soques reben l'acrònim de LLAP (*Legionella*-like amoebal pathogen), i inclouen espècies com *Legionella lytica*, *Legionella rowbothamii*, *Legionella fallonii*, *Legionella drancourtii* i *Legionella drozanskii* [36,37].

2.4. Genoma

El gènere *Legionella* té un genoma divers i dinàmic. La mida és variable des de 2.37 Mb de *Legionella adeiladensis* fins 4.88 Mb de *Legionella santicrucis* [38] i contingut GC variable [32] des de 34.82% de *Legionella busanensis* a 50.93% de *Legionella geestiana* [38].

El pangenoma de *Legionella* estudiat, que inclou actualment 58 espècies i 80 genomes [38], té com a gens nucli, presents a totes les soques analitzades, alguns gens del T4BSS Dot/icm necessaris per la seva replicació intracel·lular [32,38] i aquest gens representen aproximadament un 6% del pangenoma. Els gens accessoris (presents en dos o més soques) i els gens únics (presents en una sola soca) poden ser variables arribant a un 60% de contingut espècie-específic[32].

Els gens del T4BSS estan molt conservats, especialment el gen *DotB* que codifica per una ATPasa i el gen *IcmS* que codifica per una proteïna àcida citosòlica [38]. Aquest sistema és versàtil i codifica i secreta més de 300 proteïnes efectores dins la cèl·lula hoste. Així doncs, les proteïnes

efectores són variables entre espècies i estudis recents estimen que en conjunt de gènere arribin a 8000 [38,39]. Però, d'aquestes, només 7 s'han vist efectores-nucli presents a totes les espècies analitzades [38].

Aquesta variabilitat i plasticitat també inclou plasmidis, transposons i illes de patogenicitat genòmiques mòbils [40]. Els plasmidis tenen una mida des de 14 kb fins a 238 kb i poden codificar pilis amb capacitat de conjugació (gens tra-like per pilis del tipus F, llargs i flexibles o tipus P, curts i rígids que permeten el contacte i unió entre bacteris) [32,40].

A més, *Legionella* és naturalment competent [19,41] podent incorporar DNA extracel·lular amb la seva pròpia maquinària de recombinació [40]. Aquests elements mòbils i la seva competència natural, fan pensar que *Legionella* té una taxa de transferència horitzontal de gens (HGT) i recombinació altes. Per exemple, tenim que *Legionella hackeliae* i *Legionella pneumophila* soca *Paris* tenen exactament el mateix plasmidi [32]. Tot i això, l'intercanvi de DNA genòmic entre espècies es creu poc freqüent [39]. Aquesta incorporació de DNA per HGT fa augmentar la mida del genoma i el percentatge AT[38].

Aquesta HGT i recombinació s'ha donat també amb cèl·lules eucariotes[40] fet que explica perquè hi ha proteïnes del gènere amb dominis propis d'eucariotes o proteïnes que mimetitzen les dels eucariotes sent un dels trets més distintius del gènere. Aquestes són proteïnes que interfereixen en el funcionament de l'hoste modulant les seves funcions i permeten la seva replicació intracel·lular [32,38,40]. Moltes d'aquestes proteïnes efectores tenen dominis eucariotes (137 descrits) o són proteïnes mimètiques eucariotes (250 descrites) com proteïnes amb dominis d'anquirina, dominis U-box i F-box, esfingosina 1 fosfat liasa o dominis SET. Com a exemple, les GTPases tipus Rab són GTPases eucariotes que el gènere *Legionella* ha adquirit dels seus hostes i fins avui en dia no han estat descrites en cap altre procarionta [38]. Així doncs, moltes de les proteïnes amb motius eucariotes són desplaçades al citoplasma de l'hoste on modulen i interfereixen per la seva similitud les funcions de l'hoste afectant diferents vies [26]. Amb aquesta tàctica afavoreixen els seus propis propòsits per al creixement i multiplicació intracel·lular [34].

La recombinació homòloga a *Legionella pneumophila* sembla un factor important a la diversitat de la població bacteriana i es dona amb més freqüència en zones 'hotspot'. Aquestes zones sovint es troben en zones que codifiquen factors de virulència com el LPS, o proteïnes de membrana externa [42].

Evolutivament parlant, aquest gènere presenta guany de DNA, amb genomes cada cop més grans, a diferència d'altres gèneres bacterians [38]. Una altra característica evolutiva important

és que espècies patògenes per l'home i no patògenes estan barrejades filogenèticament. Això indica que, probablement, els gens de virulència que van fer possible la infecció d'eucariotes van ser adquirits independentment, diverses vegades i en diferents moments en el temps [32,38]. Així mateix, *Legionella pneumophila* i *Legionella longbeachae* tenen proteïnes efectores similars a les que tenen els seus hostes eucariotes i amb funcions semblants que han estat adquirides en diferents moments de l'evolució [32]. L'homologia entre proteïnes és variable i pot arribar al 35%, com a percentatge més alt entre les dues espècies amb més casos clínics: *Legionella pneumophila* i *Legionella longbeachae* [32].

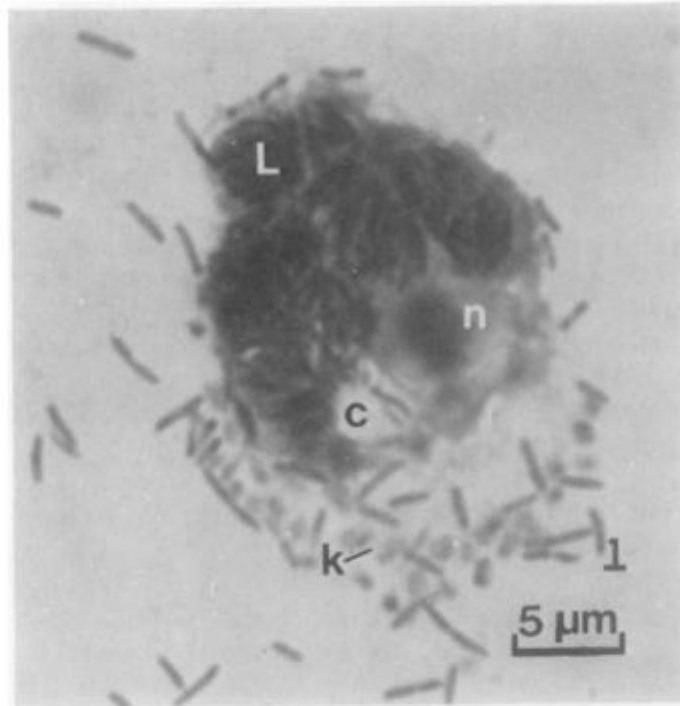
Aquests fets en conjunt donen força a la idea de la gran taxa de HGT del gènere i del seu dinamisme i diversitat [19,32,38,40].

2.5. Ecologia

El gènere *Legionella* té com a reservori principal el medi aquàtic incloent rius, llacs, aiguamolls, aigües termals, aigües subterrànies o fonts [9]; tot i que s'ha aïllat també en sediments, compost i sòls [9,43–45]. El principal mecanisme de proliferació al medi natural és la multiplicació intracel·lular dins protozous com les amebes dels quals són un important patògen[1]. Aquesta és la principal raó per la qual sovint es troben associats i la seva relació és important per l'epidemiologia de *Legionella* [19,44]. Els biofilms aquàtics també són un dels reservoris més importants, ja que fan relacions de sinèrgia amb altres organismes i treuen els nutrients necessaris per al seu creixement i multiplicació [44]. Tot i que poden presentar-se en forma planctònica lliure i amb motilitat, el medi aquàtic *per se* no té els suficients nutrients per la multiplicació bacteriana. I, en el cas que així fos, no podrien competir amb altres bacteris amb un creixement i cicle cel·lular molt més ràpid [24].

2.5.1. Amebes

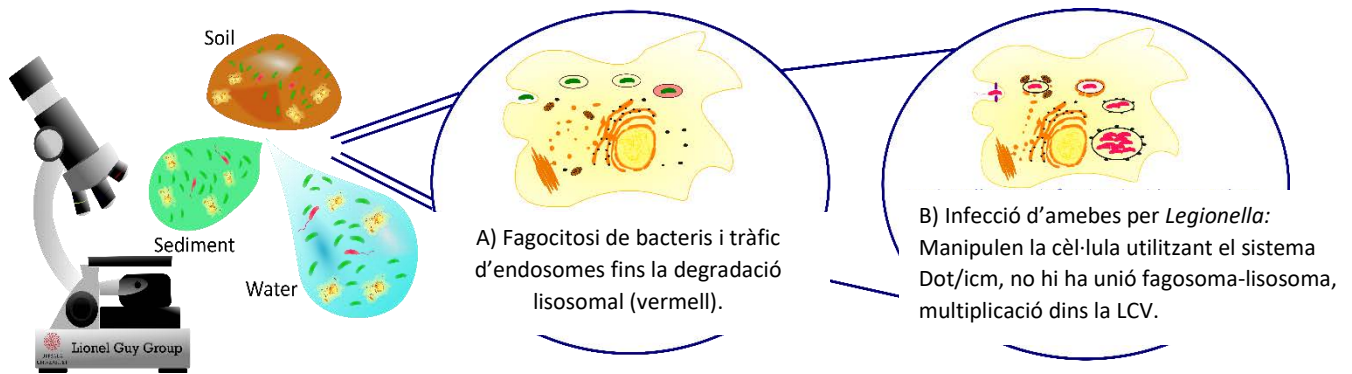
Després del seu descobriment, es va intuir que la font d'infecció de *Legionella* estava relacionada amb l'aigua. Però va ser, Rowbotham [1] qui va aportar una nova idea a la microbiologia: alguns bacteris eren capaços d'infectar organismes unicel·lulars com les amebes i utilitzaven els mateixos processos en la infecció de cèl·lules animals com els macròfags pulmonars en l'home. Així doncs, els protozous es van veure com els hostes principals i naturals de *Legionella*, mentre que la infecció dels macròfags és una infecció accidental i oportunista [24].



Imatge 7: Extreta de [1] (Rowbotham,1980). Trofozoït de *Acanthamoeba castellanii* infectada per *Legionella pneumophila* Oxford-1. Tinció modificada de Giménez. L= Vacuola que conté *Legionella*; n= nucli; c= vacuola contràctil; k= *Klebsiella* extracel·lular i l= *Legionella* extracel·lular al voltant de l'ameba.

Uns d'aquests protozoous, organismes unicel·lulars, ubics i distribuïts àmpliament a la natura són les amebes de vida lliure (FLA). Les FLA es troben en sediments, sòls i medi aquàtic, especialment, en aquells on hi ha bacteris, petites algues o petits fongs dels quals s'alimenten [46]. Un cop fagociten els bacteris, el desenllaç pot variar: (i) digestió via lisosoma, (ii) expulsió en vesícules al medi extracel·lular per un mecanisme que no se sap si depèn del bacteri o de l'hoste ni està ben estudiat, o (iii) alguns bacteris han desenvolupat estratègies per evitar la digestió i són capaços de viure dins d'elles i en alguns casos multiplicar-se [44]. En aquest últim cas, els bacteris es coneixen com a bacteris resistents a les amebes (ARB) [47]. Dins d'aquests ARB, hi ha *Legionella* i altres patògens per a l'home com els micobacteris, *Pseudomonas*, *Burkholderia cepacia* o *Stenotrophomonas maltophilia* [47,48]. Les FLA, per tant, són importants per controlar i modelar la matèria orgànica a la natura i als sistemes d'aigua artificials. Alteren la composició de les comunitats microbianes, o bé, eliminant bacteris per predació o augmentat poblacions bacterianes capaces de replicar-se al seu interior [44].

La interacció *Legionella* - hoste és perjudicial per a aquest últim. Ja que, a més de trobar un nínxol replicatiu al seu interior, créixer i multiplicar-se [2]; inhibeixen el creixement de l'hoste, la proliferació i la motilitat quimiotàctica i, en el moment de l'alliberament del bacteri al medi, el mata [44,49].



Imatge 8: (A) Ruta metabòlica per defecte a l'interior d'amebes i (B) *Legionella pneumophila* modula la ruta endocítica per establir un nínxol replicatiu dins la vacuola. Font: Tíscar Graells adaptat de [2].

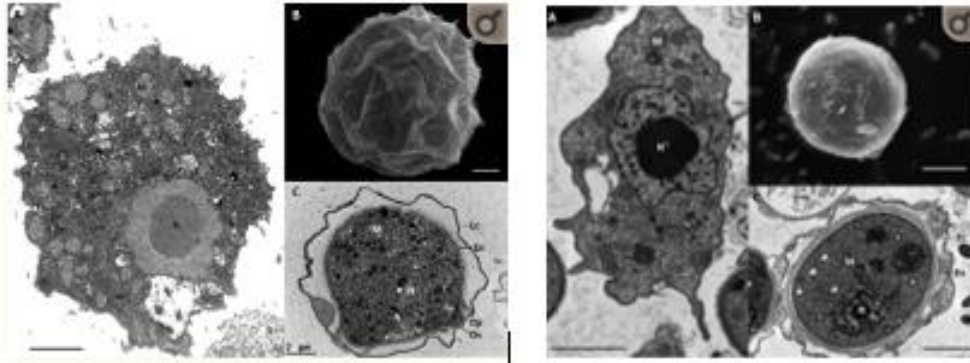
Soil= Sòl, Water=aigua

Molts dels ARB que es multipliquen en protozous estan especialitzats a créixer en un petit rang d'hostes. Però, una altra particularitat de *Legionella* és que té un gran ventall d'hostes que abasten diferents fílums de protozous com (i) Amoebozoa (*Acanthamoeba*, *Vermamoeba* (*Hartmannella*), *Dictyostelium*, *Ballamuthia*, *Echinamoeba*), (ii) Ciliophora (*Tetrahymena*, *Paramecium*) o (iii) Percolozoa (*Naegleria*, *Tetramitus*, *Willaertia*) [1,44]. Tot i que els hostes més comuns pertanyen als gèneres: *Acanthamoeba*, *Vermamoeba* (*Hartmannella*), *Tetrahymena* i *Naegleria* [9,44]. Aquest gran rang d'hostes del gènere és possible gràcies a la versatilitat gènica que tenen i que els permeten adaptar-se a les variacions dels diferents hostes. Tot i això, s'ha de mencionar que no totes les espècies poden infectar tot el rang d'hostes, les característiques de cada una fan que estiguin més especialitzades en unes espècies d'hostes i no en altres. Per exemple: *Legionella pneumophila*, *Legionella steelei*, *Legionella dumoffii*, i *Legionella norrlandica* poden multiplicar-se dins *Acanthamoeba castellanii*, però *Legionella longbeachae*, *Legionella jordanis* i *Legionella anisa* no poden [44]. Així doncs, el desenllaç també depèn de qui és qui: bacteri i hoste, i de les propietats específiques inherents a cada microorganisme.

S'ha vist que les soques de *Legionella* cultivades prèviament en FLA són més virulentes en models d'infecció animal que les legionel·les que procedien de medi de cultiu [44,50]. Així doncs, la interacció FLA-*Legionella* és un factor crític per determinar tant per la persistència del bacteri al medi com per la incidència i la severitat de la malaltia.

Però aquesta relació, encara pot ser molt més complicada, ja que les amebes sota circumstàncies desfavorables passen d'estar d'una forma activa anomenada trofozoït, que es divideix per mitosi, a una forma dorment i amb un metabolisme baix anomenat cist que no es reproduïx [3]. Aquests cists tenen una doble paret amb porus i resisteixen condicions desfavorables. Quan

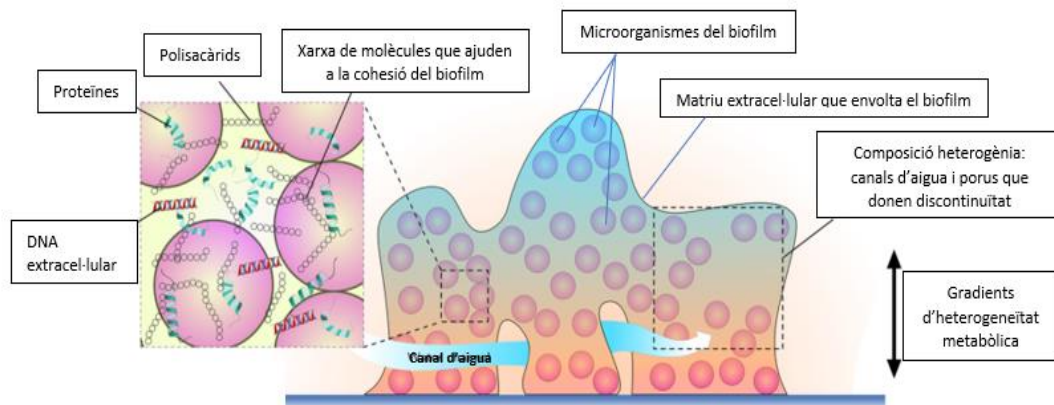
les condicions tornen a ser òptimes, es desenquisten i tornen a passar a l'estadi de trofozoït actiu [3]. Les legionel·les no solen infectar les FLA quan estan en forma de quist, però si les amebes decideixen enquistar-se un cop estan dins, els proporcionen un entorn estable i protegit [51].



Imatge 9: Extret de [3] (Fouque, 2012); Dreta: *Acanthamoeba* spp. Microscopi electrònic de Transmissió: (A) Trofozoït i (C) Cist. Microscopi electrònic d'escaneig (B) Cist. Esquerra: *Vermamoeba (Hartmannella)* spp. Microscopi electrònic de Transmissió (A) Trofozoït i (C) Cist. Microscopi electrònic d'escaneig (B) Cist. Barra (escala): 2µm. N=nucli, M= mitocondri, Ec=exocist, En= endocist.

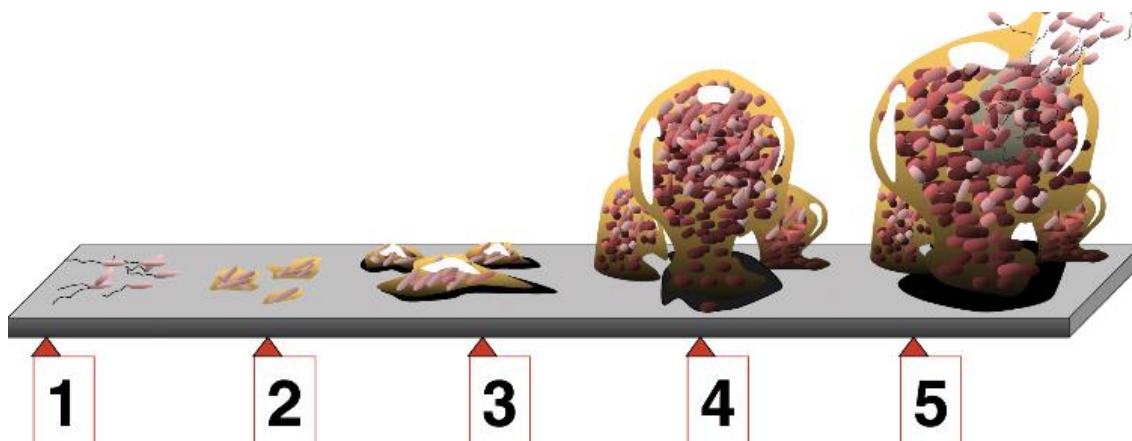
2.5.2. Biofilms

Les legionel·les també poden trobar-se associades a biofilms, que no deixen de ser una altra forma de resistència front condicions adverses. Els biofilms estan formats per matrius molt complexes de diferents microorganismes: bacteris, algues, petits fongs i FLA, que són gran consumidores de biofilms [9,44]. Les cèl·lules del biofilm estan rodejades d'una matriu extracel·lular rica en polisacàrids, proteïnes, enzims, àcids nucleics i lípids [52]. És aquesta matriu extracel·lular la que dóna l'estabilitat mecànica al biofilm i la responsable de l'adhesió a superfícies o a l'adhesió cohesiva entre cèl·lules per formar una xarxa 3D que interconnecta i immobilitza temporalment les cèl·lules immerses [4,52]. Les microcolònies immerses a la matriu estan separades entre elles per canals que permeten el transport de nutrients, oxigen i material genètic entre altres. Així, els diferents gradients de nutrients, pH, oxigen i temperatura supleixen les variades necessitats dels diferents microorganismes que formen el biofilm [53,54].



Imatge 10: Heterogeneïtat d'un biofilm: Bacteris envoltats d'una matriu extracel·lular polisacàrida amb diferents gradients de nutrients i ampliació de la composició interior de la matriu extracel·lular. Font: Extret i adaptat de [4].

Són unes estructures dinàmiques que estan en canvi continu en espai i en temps i que permeten una millor supervivència de tots els microorganismes associats [5,53]. Els biofilms poden desprendre's parcialment per diferents motius, com la pressió de l'aigua, fent possible la colonització d'altres parts i facilitant la seva extensió dins els sistemes d'aigua. Generalment, el biofilm presenta tres fases principals amb 5 passos diferenciats: (i) unió substrat-bacteris o bacteris-bacteris mitjançant estructures d'adherència, (ii) maduració del biofilm i (iii) alliberament i dispersió parcial a l'ambient [5,53].



Imatge 11: Passos necessaris per a la formació i maduració d'un biofilm. 1) Contacte i unió reversible al substrat. 2) Unió irreversible. 3) Creixement i maduració inicial 4) Maduració i 5) Alliberament i dispersió parcial. Font: Extret de [5].

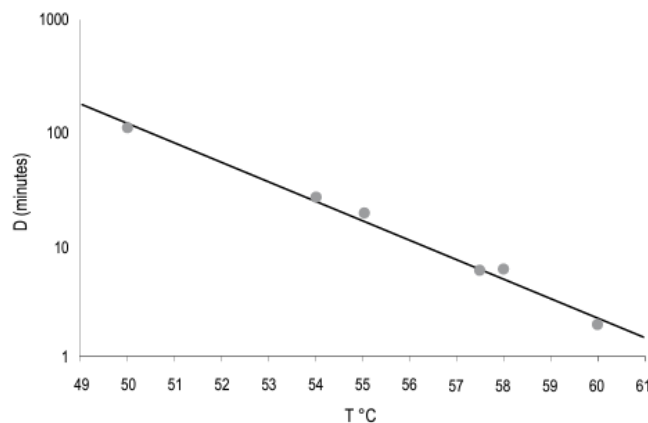
Dins els biofilms, les legionel·les estan en gran part en forma sèssil [9,24] però poden passar a la forma planctònica i alliberar-se a l'aigua [9]. Els biofilms les podrien protegir i podrien proporcionar els nutrients necessaris per al creixement i multiplicació inclús fora del medi intracel·lular al qual estan adaptades [44]. La caracterització de *Legionella* en aquests ecosistemes és difícil, però estudis amb models de biofilms han demostrat que la replicació de

Legionella pneumophila dins d'aquests era dependent de la presència dels seus hostes, és a dir, de FLA. Tot i que, sense elles, les cèl·lules poden persistir [24,51].

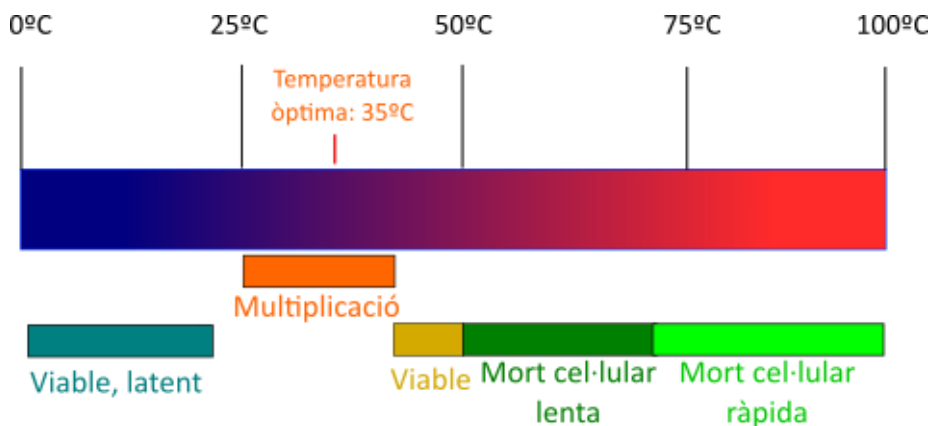
2.5.3. Temperatura

Legionella és un bacteri termotolerant, capaç de sobreviure en un rang de temperatura ampli (4°C fins més de 60°C). Tot i això, es multipliquen entre 25°C i 42°C, amb una temperatura òptima de 35°C [19].

El manteniment de la temperatura fora del rang òptim per al seu creixement és el que permet mantenir mesures bàsiques i efectives de control als sistemes d'aigua. Així doncs, els sistemes d'aigua han d'evitar rangs de temperatura entre 25°C - 45°C per evitar ser colonitzats. Idealment, els sistemes d'aigua freda s'han de mantenir per sota els 20°C i els d'aigua calenta per sobre els 50°C (Bartram, WHO, 2007). Tot i així, en presència de biofilms, aquestes mesures de control no són suficients, ja que els bacteris immersos estan protegits i temperatures molt més elevades serien necessàries per afectar *Legionella* [55].



Imatge 12: Temps de reducció decimal de *Legionella pneumophila* s1 a diferents temperatures (D = minuts necessaris per reduir el 90% de la població). Font: Bartram,WHO,2007.



Imatge 13: Esquema de l'efecte de la temperatura en la viabilitat de *Legionella*. Font: Tiscar Graells.

La temperatura exterior també pot afectar la relació entre *Legionella* i els seus hostes. La capacitat de creixement i replicació dins les FLA pot ser dependent de temperatura [19,32] i no només això, sinó que la temperatura exterior també modula la motilitat i la virulència del bacteri [19]. L'expressió flagel·lar o de pilis és més elevada a 30°C que a 37°C, l'adherència és més elevada a 25°C que a 41°C i *Legionella pneumophila* cultivada a 24°C és menys virulenta que cultivada a 37°C. Un augment de la temperatura per sobre dels 37°C a la natura, pot significar un estrès ambiental al qual el bacteri respon [56].

A més segons l'hoste, el rang de temperatura pot portar a un desenllaç diferent: amb un hoste més restrictiu com *Acanthamoeba polyphaga* la infecció es dona si la temperatura és superior a 25°C mentre que si és inferior, *Legionella* és consumida [44], o com en el cas de *Tetrahymena* on *Legionella* pot replicar-se a 35°C fàcilment però és expulsada de la cèl·lula a temperatures més baixes [44].

Així doncs, la temperatura és un dels factors clau en el cicle de *Legionella* i afecta en molts aspectes relacionats i sense ser excloents entre ells [44]: creixement, amplificació, motilitat, adherència (inclòs biofilms), canvi de comportament segons espècie o soca de *Legionella* o canvi en la relació amb la cèl·lula hoste.

2.5.4. Relació amb altres bacteris

A la natura, els microorganismes competeixen pels mateixos nutrients i aquells més adaptats al medi extracel·lular podrien tenir avantatges front *Legionella*, que és un bacteri adaptat al medi intracel·lular i amb un metabolisme molt més lent. Així, el creixement de *Legionella* s'ha vist inhibit per la presència d'altres bacteris com els del gènere *Bacillus*, o el gènere *Pseudomonas* o bacteris de la microbiota oral [1]. En el cas de *Pseudomonas aeruginosa*, l'autoinductor de quòrum sensing 3-oxo-C12-HSL inhibeix la formació de biofilms de *Legionella pneumophila* [57].

La comunicació per quòrum sensing en el mateix gènere *Legionella* també sembla important. LAI-1 és l'autoinductor del sistema de quòrum sensing i és l'únic descrit actualment a l'espècie *Legionella pneumophila* [57]. Aquest sistema consta de LqsA (: la sintetasa de l'autoinductor), LqsA, les quinases LqsS com a sensors i el regulador de resposta LqsR. No està clar que aquest sistema participi en funcions com la formació del biofilm, però, sí que és homòleg al d'altres bacteris gramnegatius on sí hi té relació amb la virulència dependent de contacte i formació de biofilms [57].

2.5.5. VBNC (Cèl·lules viables però no cultivables)

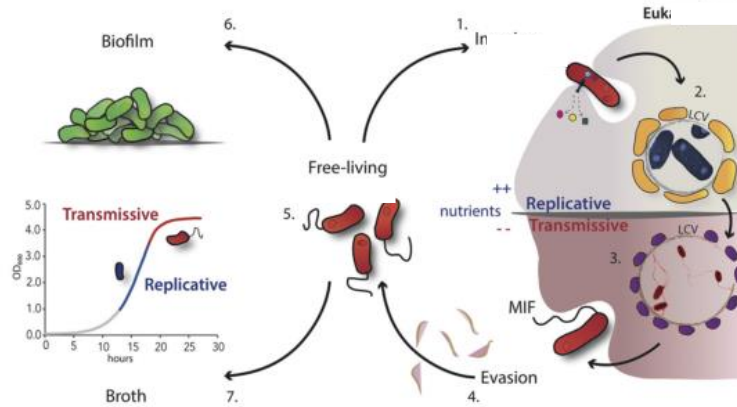
Legionella pot presentar-se en forma de cèl·lules viables però no cultivables. Aquestes cèl·lules tenen membranes més gruixudes, més resistència a factors químics i ambientals i taxes metabòliques més baixes [58], i tot i que són viables no poden créixer en cultiu. Aquesta diferenciació cap a VBNC es dona per condicions desfavorables o estressants [59] per al bacteri com desinfeccions (clor, temperatura) o condicions de fam o escassetat de nutrients [58]. En el cas de legionel·les que han patit escassetat de nutrients, la resistència a temperatura o clor és més elevada [58]. A més, no totes les cèl·lules VBNC són iguals [60] i podem trobar diferents cèl·lules depenent de la fase del cicle cel·lular en el que es trobaven originàriament. La recuperació de VBNC *Legionella* en cultiu sembla ser més eficient després del cultiu amb amebes [58]. Aquest estadi encara dificulta més l'estudi de *Legionella* ja que mètodes com el cultiu no les detecten i poden ser obviades.

2.5.6. Cicle cel·lular

El cicle cel·lular de *Legionella* al seu nínxol ecològic natural consta d'una fase extracel·lular i d'una altra intracel·lular. Durant les diferents fases està exposada a diferents rangs de temperatura i nutrients als que s'han de poder adaptar [26]. El seu cicle cel·lular consta de diferents estadis però el més simple i millor estudiat és el cicle bifàsic [60] amb un estadi de replicació i un estadi de transmissió. Quan les condicions són òptimes (nutrients, temperatura) expressen pocs factors de virulència i es troben en forma RPF (estadi cel·lular replicatiu). Si les condicions canvien (manca de nutrients, augment de la temperatura) passa a la forma MIF (estadi cel·lular de transmissió) i es torna mòbil amb expressió de flagel(s), si en té, i més resistent [26]. Aquesta MIF és la que trenca la cèl·lula i s'allibera a l'ambient per començar un nou cicle d'infecció amb un altre hoste i conseqüentment, la MIF té els factors de virulència altament expressats.

Durant la fase replicativa, la transcripció de gens relacionat amb el metabolisme d'aminoàcids s'incrementa. Durant la fase de transmissió, *Legionella pneumophila* expressa proteïnes efectores del T4BSS Dot/icm que inclouen gens de síntesi de flagel i altres factors de virulència [26].

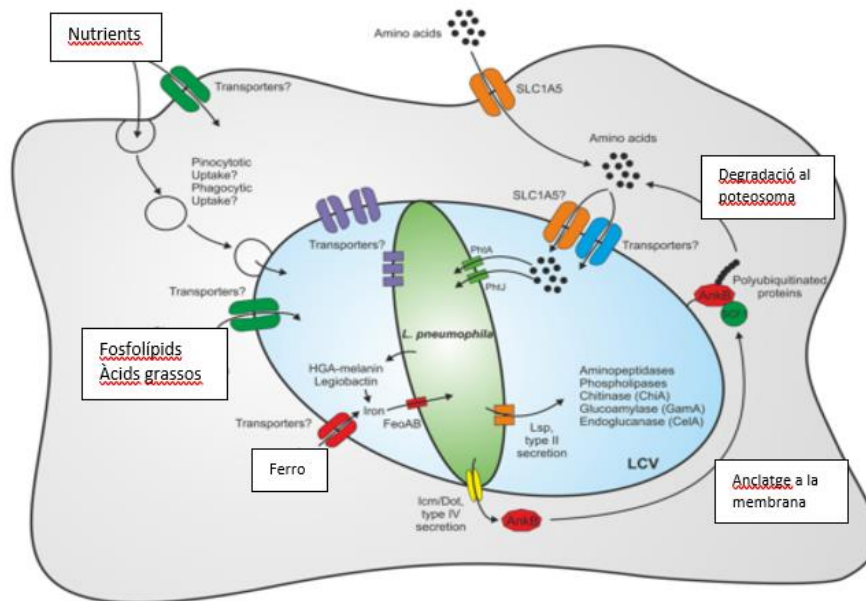
El control per passar d'una fase a l'altra és complex i involucra una gran quantitat de gens. Per minimitzar el cost energètic, *Legionella pneumophila* utilitza una estratègia d'expressió gènica dual. És a dir, quan les condicions són favorables, els factors de virulència no són necessaris i, per tant, no són expressats. Per altra banda, quan les condicions són adverses, els gens de virulència i transmissió s'expressen però els bacteris no es repliquen [6].



Imatge 14: Esquema dels diferents estadis de *Legionella pneumophila* durant el seu cicle cel·lular. (1) Entrada a la cèl·lula hoste (2) Multiplicació dins la LCV, evasió de la fusió fagosoma-lisosoma (3) Condicions desfavorables i manca de nutrients condueixen al canvi de fase, expressió de gens de virulència (4) Bacteris lisen la vacuola i l'hoste i són alliberats al medi extracel·lular (5) MIF de *Legionella* a l'ambienten forma lliure (6) Pot acabar formant part d'un biofilm (7) *Legionella pneumophila* en cultiu líquid també té un cicle bifàsic amb formes semblants a les que es poden observar al medi natural. Font: Adaptat de [6].

A la fase de creixement de *Legionella pneumophila* els transportadors PhtA/J busquen i importen aminoàcids cap a la LCV (vacuola que conté legionel·la). Aquest transport actiu d'aminoàcids del citoplasma a la vacuola de replicació també es fa utilitzant transportadors d'aminoàcids de l'hoste com SLC1A5, que està sobre expressat a la cèl·lula infectada. El ferro necessari per a la replicació és transportat pel sistema FeoAB a la LCV. El T4BSS Dot/icm també transposa proteïnes efectores a través de la membrana per interferir en els processos cel·lulars de l'hoste. El substrat AnkB del T4BSS canvia el metabolisme dels aminoàcids i la degradació de proteïnes segregant la maquinària d'ubiquitinació i el proteosoma, i d'aquesta manera proporciona aminoàcids per al creixement cel·lular dins la LCV[7].

Aquest substrat AnkB és molt important i un dels que presenta diferents dominis eucariotes com (i) F-box (interacció amb la lligasa d'ubiquitina de l'hoste SCF1), (ii) dos dominis ANK (que regulen la interacció proteïna-proteïna) i (iii) el domini CaaX que es pot modificar i fer que el substrat AnkB passi a formar part de la membrana de la LCV. Un cop a la membrana, agrupa proteïnes que han de ser degradades al proteosoma i, en canvi, les utilitza per acumular aminoàcids que són consumits a la replicació intracel·lular dins la LCV [7].

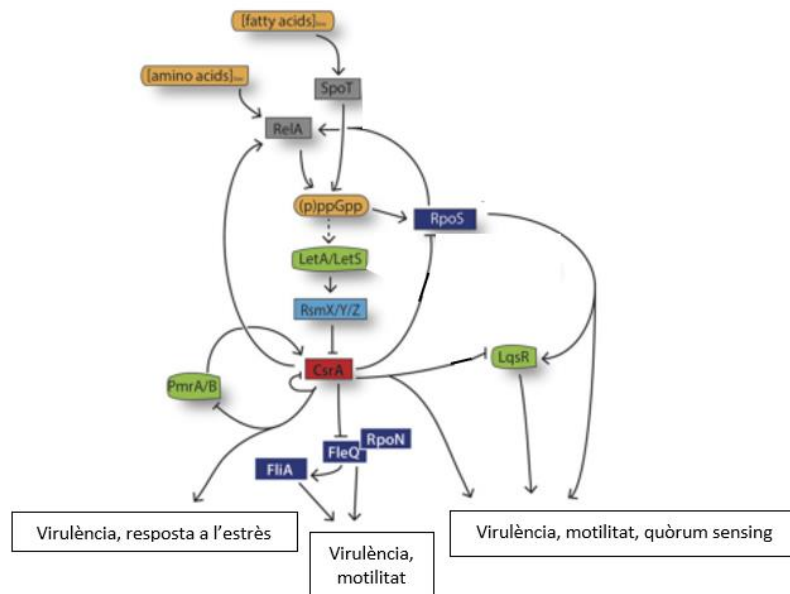


Imatge 15: Metabolisme esquematitzat de *Legionella pneumophila* dins els compartiments cel·lulars. Durant la infecció es forma un compartiment permissiu per a la replicació o LCV. Des d'aquí el bacteri té accés als nutrients necessaris per a la replicació, especialment aminoàcids, gràcies a transportadors cel·lulars com PthA/PthJ, AnkB o FeoAB. Font: Adaptat i simplificat de [7].

Durant el creixement exponencial, els recursos de la cèl·lula i els aminoàcids es van consumint fins que arriben a concentracions crítiques tals que els RNA de transferència no es carreguen amb aminoàcids. En aquest moment, *Legionella pneumophila* allibera la molècula ppGpp una proteïna sintetitzada per RelA i SpoT que alerta de condicions adverses [26]. El ppGpp es va acumulant i estimula la transició de RPF a MIF. Utilitzant el factor sigma RpoS, el ppGpp activa la via reguladora de la transmissió: LetA/LetS. El factor RpoS és indispensable per la motilitat i per l'evasió de la digestió endocítica i regula un altre factor sigma, FliA, que intervé en la formació del flagel activant FlaA, citotoxicitat depenent de contacte, evasió de la unió amb el lisosoma, infectivitat i formació de biofilm [6,26]. Al activar-se la via LetA/LetS, s'activen uns RNA petits (RsmX/Y/Z) que actuen segrestant CsrA, una proteïna repressora dels gens de transmissió i consegüentment permetent l'expressió d'aquests.

La proteïna CsrA a la vegada actua sobre (i) el regulador LqsR del sistema de quòrum sensing i contribueix a la virulència i a la formació de la LCV enviant senyals a les quinases LqsS per activar LqsA i sintetitzar l'autoinductor LAI-1 [26], (ii) el regulador FleQ, que afecta FliA, (iii) el factor sigma regulador RpoS i (iv) controla més de 40 substrats del T4BSS Dot/icm [6].

Quan *Legionella pneumophila* troba un nou hoste i torna al medi intracel·lular, torna a la forma RPF començant un nou cicle.



Imatge 16: Esquema model de la resposta de diferenciació de *Legionella pneumophila*. Font: Adaptat i simplificat de [6].

2.5.7. Sistemes de distribució d'aigua artificials

Els sistemes aquàtics artificials són reservoris de gran importància epidemiològica perquè tenen una concentració més elevada de microorganismes en comparació amb els medis naturals [44,61] com a conseqüència d'una temperatura mitjana més elevada en els primers [24].

Encara que la concentració canviï, la distribució d'hostes de *Legionella* en fonts d'aigua s'ha vist gairebé uniforme amb algunes excepcions. Els fílums Amoebozoa i Percolozoa es varen aïllar de forma predominant en totes les fonts d'aigua, tant naturals com artificials, i als sòls analitzats. El fílum Amoebozoa va ser el més comú en les torres de refrigeració i en els sistemes d'aigua potable [44].

Els sistemes que poden estar colonitzats inclouen: cases privades, restaurants, spas, hospitals, hotels, creuers o sistemes d'aigües residuals [9]. Tot i els tractaments preventius o de xoc, s'ha pogut aïllar *Legionella* als sistemes d'aigua d'hotels, creuers i hospitals, fet que mostra la seva ràpida adaptabilitat per colonitzar o persistir en aquests sistemes [9].

2.6. Patogenicitat i factors de virulència

2.6.1. T4BSS

El sistema Dot/icm (Defect in organelle trafficking / intracellular multiplication) pertany als sistemes de secreció tipus IV, en concret al tipus B (T4BSS) i és el principal sistema de patogenicitat al gènere *Legionella* i està present en tot l'ordre *Legionellales*. Aquest sistema transfereix proteïnes efectores dins la cèl·lula hoste en un procés que requereix contacte cèl·lula-cèl·lula i ATP. A dia d'avui hi ha més de 300 proteïnes efectores que son desplaçades pel sistema Dot/icm a *Legionella pneumophila* i que intervenen en tots els processos implicats en la vida intracel·lular: replicació, establiment de la LCV, entrada dins l'hoste, inhibició del procés apoptòtic i alliberament al medi [26]. Aquest T4BSS forma un porus format per les proteïnes IcmQ-IcmR que alliberen proteïnes efectores al citoplasma de l'hoste utilitzant xaperones com IcmS o IcmW per a la seva translocació [26]. Les proteïnes efectores poden ser diferents entre espècies indicant que no són essencials o indicant un nínxol ecològic específic per cada espècie [26].

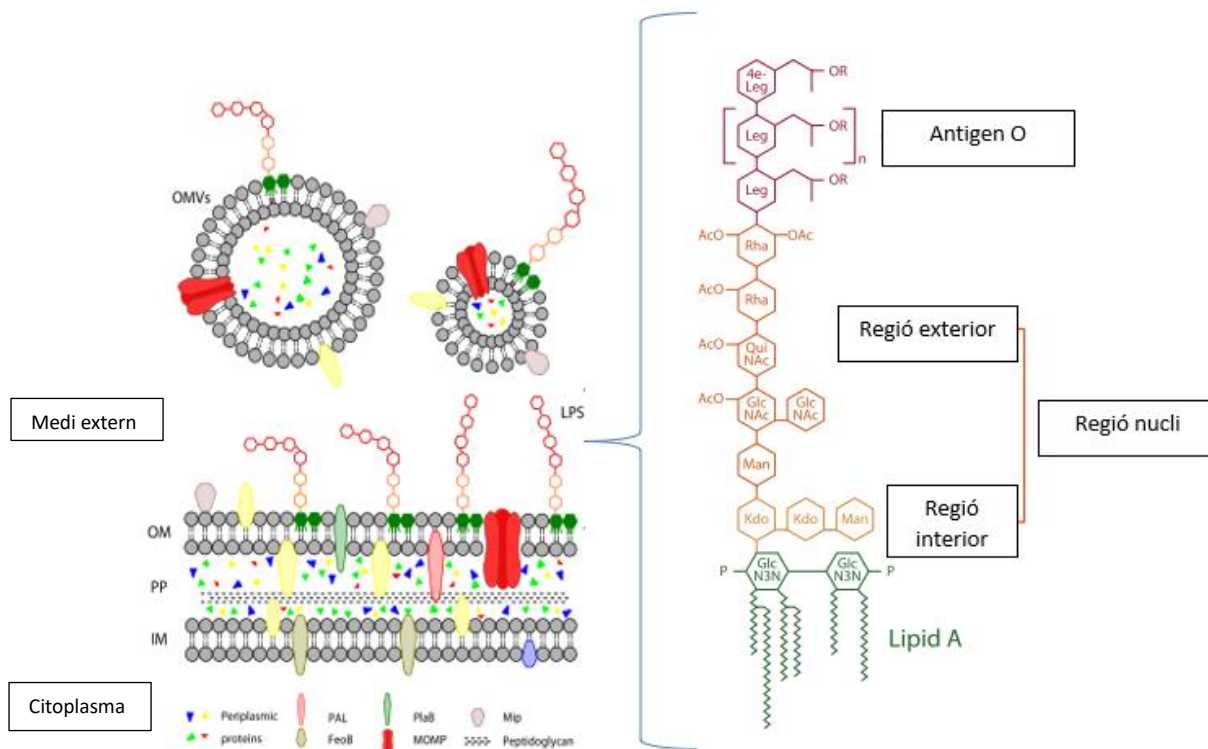
Aquest T4BSS intervé en els següents processos de l'hoste [26]:

- Tràfic de vesícules i inhibició de l'acidificació dels endosomes
- Replicació dins la LCV
- Regulació de GTPases de l'hoste
- Traducció de proteïnes de l'hoste i inducció de respostes d'estrès
- Inhibició apoptosis
- Interferència de les vies d'ubiquitinació de l'hoste

El gènere *Legionella* també té un sistema de secreció tipus II (T2SS) que és important en la virulència i la replicació dins la LCV [7].

2.6.2. Envoltament cel·lular

L'envoltament cel·lular de *Legionella* permet el contacte directe amb l'ambient i amb altres microorganismes. Aquest contacte depèn de les estructures de superfície i aquestes últimes poden tenir variacions depenent de la fase del cicle cel·lular. L'estructura de la paret bacteriana de les legionel·les té una típica estructura de bacteri gramnegatiu que consta de: membrana interna, periplasma i membrana externa.



Imatge 17: Esquema de la paret bacteriana de *Legionella pneumophila* i detall del LPS. Font: Adaptat de [8].

CP= citoplasma, IM= membrana interna, PP= periplasma, OM= membrana externa, OMV = vesícules de membrana externa, LPS, PAL= lipoproteïna associada al peptidoglicà, FeoB= transportador de ferro, PlaB= fosfolipasa A, MOMP= proteïna major de membrana externa, Mip= potenciador de la infectivitat al macròfag, (e) Leg= àcid (epi)legionamínic, Rha= ramnosa, Man=manosa, QuiNAc= acetilquinosamina, GlcNAc= acetilglucosamina, Kdo= àcid 3-deoxi-d-mano-oct-2-ulósic, P=fosfat i Oac/AcO= O-acetil

La membrana interna de la paret bacteriana de legionella té com a fosfolípids principals: fosfatidiletanolamina i fosfatidilcolina. També hi ha petites quantitats de cardiolipina i fosfatidilglicerol. Una de les funcions principals de la membrana interna és la regulació del transport de ferro. L'adquisició de ferro (Fe (II)), via el transportador dependent de GTP FeoB, és un dels processos crucials per al creixement del gènere *Legionella*. Així doncs, el transportador FeoB és indispensable per a la virulència en models animals.

El periplasma està format per proteïnes solubles que li donen una consistència de gel i peptidoglicà. El peptidoglicà de *Legionella pneumophila* conté àcid muràmic, glucosamina, àcid glutàmic alanina i àcid meso-diaminopimèlic (meso-DAP). Els residus meso-DAP i alanina contribueixen als enllaços entrecreuat del peptidoglicà, el qual constitueix una capa estable per sobreviure en condicions hostils [8]. Aquest peptidoglicà és reconegut dèbilment per receptors al citoplasma de l'hoste que activen la resposta inflamatòria. El periplasma també conté enzims. Un dels més característics, perquè no és comú en el món bacterià però sí en eucariotes, és la

coure - zinc superòxid dismutasa (Cu-Zn-SOD) que ajudaria a combatre l'estrès oxidatiu dels bacteris quan no hi ha hostes disponibles [8].

La membrana externa de la paret bacteriana està composta per: bicapa lipídica, lipoproteïnes, el LPS i proteïnes. La bicapa lipídica està formada per fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, cardiolipina, mono-metil-fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol i di-metil-fosfatidiletanolamina [8]. La fosfatidilcolina no és un lípid habitual al món bacterià ja que només el 10% dels bacteris contenen aquest fosfolípid [8]. Aquest fosfolípid ajuda a la unió amb els macròfags i recentment s'ha vist que algunes legionel·les, com *Legionella bozemanæ*, poden sintetitzar-lo a partir de colina exògena [8]. La majoria de proteïnes de la membrana externa estan relacionades amb l'adherència o la invasió de cèl·lules hoste. Una d'aquestes és la proteïna PAL (lipoproteïna associada al peptidoglicà) que activa la resposta inflamatòria mitjançant Toll-Like Receptor (TLR-2). Les proteïnes PlaB (fosfolipasa A), MOMP (proteïna major de membrana externa), Hsp60 i Mip (potenciador de la infecció del macròfag) són les principals involucrades en la virulència de la membrana externa. La proteïna PlaB té activitat hemolítica contacte dependent i és molt important per la infecció en models animals. La proteïna MOMP intervé en l'adherència a les cèl·lules hoste. La proteïna Hsp60 és important en l'adherència i invasió en models cel·lulars i la proteïna associada a la membrana Mip és una isomerasa que s'uneix al col·lagen i es necessària per a la replicació en cèl·lules hoste i per travessar la barrera epitelial respiratòria [8].

El LPS està localitzat a la membrana externa de la paret bacteriana i és un dels principals antígens activadors de la resposta immune. El LPS de les legionel·les té un paper important en la interacció amb les cèl·lules hoste i en el tràfic intracel·lular, independent de la modulació d'aquest tràfic pel T4BSS Dot/icm. El LPS està format pel lípid A, també anomenat endotoxina, una regió nucli i l'antigen O. El LPS millor estudiat torna a ser el de *Legionella pneumophila*, ja que causa aproximadament el 90% de les LD. Depenent de l'antigen O, *Legionella pneumophila* pot ser dividida en 16 serogrupos i dins de cada serogrup hi ha subgrups monoclonals. El serogrup de *Legionella pneumophila* que causa més casos de LD és el serogrup 1 (aproximadament un 85% dels casos) i aquest serogrup pot ser dividit en 10 subgrups [8].

En comparació amb el LPS d'altres gramnegatius, el de *Legionella pneumophila* té una estructura única ja que presenta abundants àcids grassos ramificats de cadena llarga i elevats nivells de grups acetil que el fan altament hidrofòbic [8].

L'antigen O de *Legionella pneumophila* és un homopolímer del sucre anomenat àcid legionamínic (àcid 5-acetamidino-7-acetamido-8-O-acetyl- 3,5,7,9-tetradexy-l-glycero-d-galacto-nonulosònic) [8]. Aquest sucre no té grups hidroxils lliures i, conseqüentment, és molt

hidrofòbic. La regió nucli exterior del LPS també té propietats hidrofòbiques i està formada per un oligosacàrid compost per ramnosa, manosa, acetilglucosamina (GlcNAc) i acetilquinosamina (QuiNAc). En canvi, la regió nucli interior és hidrofílica i està unida al lípid A. Aquest lípid A conté inusualment àcids grassos de cadena llarga ramificats, que podrien ser els responsables del seu baix potencial com endotoxina. Això vol dir que la seva habilitat per induir una resposta inflamatòria és baixa i podria evitar que *Legionella pneumophila* sigui reconeguda pel sistema immune [8].

Les legionel·les, com molts altres gramnegatius, són capaces d'alliberar vesícules de membrana externa de la paret bacteriana. Les vesícules de *Legionella pneumophila* tenen una mida de 100 a 250 nm de diàmetre i contenen part de periplasma envoltat de la membrana externa de la paret bacteriana. Les vesícules de membrana externa contenen proteïnes i factors de virulència que tenen activitat lipolítica i proteolítica podent matar altres bacteris [8]. Les vesícules de membrana externa també estan involucrades en funcions com la formació de biofilms, quòrum sensing i la modulació de la resposta inflamatòria [8].

2.6.3. Pilis i flagel

Legionella pneumophila presenta pilis de diferents longituds. Els pilis de tipus IV (llargs de 0.8 a 1.5 µm) són els més importants per a la virulència del bacteri i estan formats per les proteïnes PilE i PilD. Estan implicats en funcions d'adherència a cèl·lules hoste, en la competència natural del bacteri i en la formació de biofilms [8].

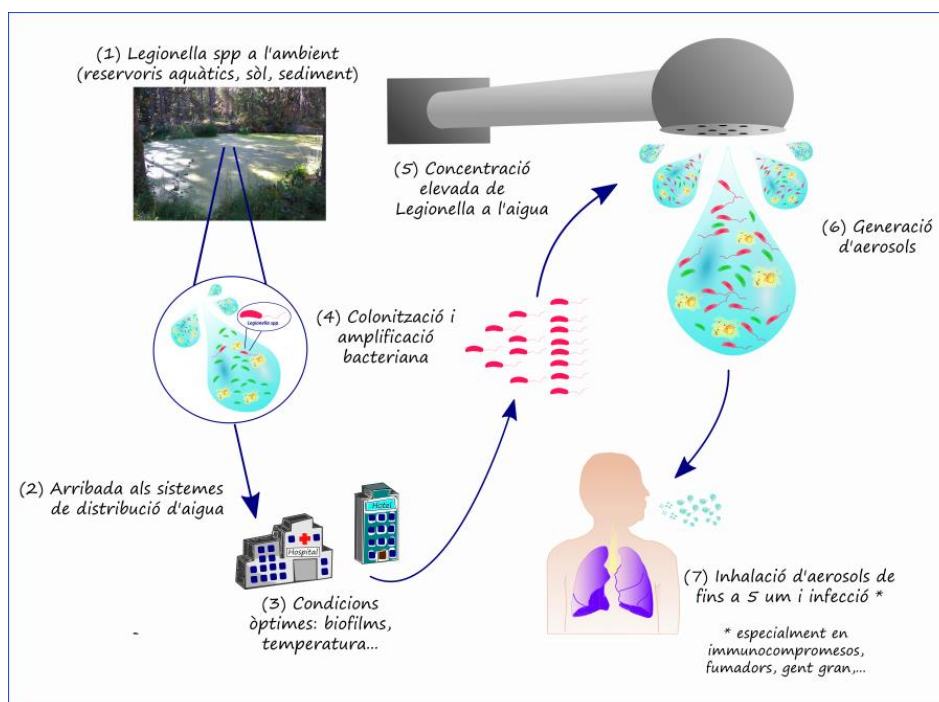
El flagel és un dels principals factors de virulència de la MIF de *Legionella*. Malgrat això, no totes les *Legionella* presenten flagel, *Legionella longbeachae* o *Legionella oakridgensis* no en tenen [18]. *Legionella pneumophila* presenta un únic flagel monopolar ancorat a ambdues membranes (interna i externa) i al peptidoglicà pel cos basal del flagel. El flagel és clau per a la motilitat i per la invasió de les cèl·lules hostes. La seva expressió està altament regulada per vies de senyalització que van lligades al canvi de fase cap a la forma de transmissió del cicle cel·lular. Els reguladors de l'expressió flagel·lar també estan involucrats en altres factors de virulència com la citotoxicitat i l'evasió lisosomal [8]. La flagel·lina és reconeguda per receptors de la família TLR i NLR que porta a l'activació de gens inflamatoris, a l'activació de la mort cel·lular regulada per caspases i, conseqüentment, és una de les proteïnes responsables de la resposta inflamatòria [8,10].

2.7. Manifestacions Clíniques

Les manifestacions clíniques s'engloben en el terme legionel·losi que inclou les dues formes més comuns de malaltia per *Legionella*: la LD i la malaltia de Pontiac.

2.7.1. Mecanismes de transmissió

La via d'entrada és el tracte respiratori i el mecanisme de transmissió habitual són els aerosols de fins a 5 µm que continguin el bacteri, ja que, aquests són els que poden arribar per inhalació als alvèols pulmonars on queden retinguts. Els humans són considerats hostes accidentals que no transmeten la malaltia [9,44] encara que s'ha documentat un únic possible cas de transmissió persona – persona [62]. S'ha contemplat també la possibilitat de transmissió inhalant aerosols que continguin protozous infectats, fet que explicaria el perquè la transmissió persona-persona és quasi inexistent[1]. En qualsevol cas, les fonts que puguin generar aerosols són possibles transmissores de *Legionella* [56] incloent fonts ornamentals, dutxes, torres de refrigeració, aparells d'humidificació, aparells de teràpia respiratòria, aigua de pluja [63], banyeres d'hidromassatge entre d'altres [9,64–66]; especialment, si en algun tram del circuit es donen circumstàncies i condicions favorables per l'augment de la concentració de *Legionella* a l'aigua. Un d'aquests factors és l'augment de la temperatura de l'aigua, que pot fer variar l'equilibri amebes-*Legionella* augmentat la multiplicació del bacteri dins els protozous. Com a conseqüència la concentració del bacteri a l'aigua augmenta i el risc de transmissió i de manifestació de la malaltia també [19,24].



Imatge 18: Circuit de transmissió de *Legionella*. Font: Tíscar Graells, adaptat de [9].

2.7.2. Formes clíniques i factors de risc:

2.7.2.1. Malaltia del legionari (LD)

La malaltia del legionari (LD) és una malaltia respiratòria febril que cursa amb pneumònia (comunitària i nosocomial). És rara la legionel·losi extrapulmonar deguda a una eventual disseminació hematògena amb infecció (endocarditis, miocarditis, cel·lulitis, entre altres) [9]. Les manifestacions clíniques i radiològiques no permeten diferenciar la LD d'altres pneumònies [9,24,67], per això els mètodes de diagnòstics són importants a l'hora de determinar l'agent causal. En pacients immunodeprimits s'han observat infiltracions nodulars als pulmons que tenen tendència a fer cavitacions [67]. Es creu que *Legionella* representa un 2-9% de les pneumònies diagnosticades, però tot i això, podrien estar infravalorades [9]. Les pneumònies associades a *Legionella* tot i tenir tractament antibiòtic eficaç presenten una severitat més alta i un índex de mortalitat que pot arribar al 30% [9].

El període d'incubació pot ser de 2 a 10 dies i la simptomatologia inclou: febre (arribant a 39.4°C en un 70% dels casos), tos seca i no productiva, miàlgies, mal de cap, rigor, dispnea, diarrea i deliris amb confusió i letargia (60% dels casos)[24,67].

S'ha vist que la majoria de casos de LD es concentren a finals d'estiu i a la tardor. A més, les persones d'edats avançades són més susceptibles i els homes també, representen més del 50% dels casos [9,26]. Immunodeprimits o persones amb malalties respiratòries cròniques associades, com la malaltia obstructiva pulmonar crònica, també són més susceptibles [9,26]. Altres factors de risc relacionats amb la malaltia són: tabaquisme, alcoholisme, diabetis, càncer o malaltia renal[9].

Legionella, *Mycoplasma*, *Chlamydothila*, *Coxiella* i virus respiratoris són microorganismes causals del que clínica i radiològicament anomenem: pneumònia atípica.

2.7.2.2. Malaltia de Pontiac

El gènere *Legionella* spp pot causar una altra malaltia anomenada malaltia de Pontiac. El nom ve donat pel primer brot conegut d'aquesta malaltia, que va passar a Pontiac, Michigan. La malaltia de Pontiac o febre de Pontiac és una malaltia limitada que es resol espontàniament, sense mortalitat associada, amb símptomes respiratoris semblants a una grip o refredat, sense pneumònia i amb una capacitat de propagació alta [9,14,67], que només es detecta quan es produeix un brot [56,67]. No està clar si la malaltia és causada per l'endotoxina de *Legionella*, conseqüència d'una resposta immune massiva enfront el patogen [9,27,56], *Legionella* associada a amebes o causada per *Legionella* viables però no cultivables [9].

El període d'incubació és aproximadament de 36 hores [14] i els símptomes són: febre, tos seca, miàlgia i mal de cap. Es resol en uns dies sense cap tractament [67]. Per la seva simptomatologia es creu que la taxa d'incidència d'aquesta està infravalorada, ja que en molts dels casos els pacients no van al metge o si ho fan el diagnòstic sovint es confon amb un quadre víric [14]. De totes maneres, és important saber que els pacients amb febre de Pontiac fan seroconversió per *Legionella* però, de moment, el bacteri no ha estat aïllat de cap pacient [56].

2.7.2.3. Formes extra-pulmonars

Les formes extrapulmonars són poc freqüents tot i que els casos podrien estar infravalorats [67] ja que, fora de l'àmbit respiratori, els medis de cultiu que s'usen habitualment no tenen els requeriments necessaris per al creixement de legionel·la. Per aquest motiu aquestes infeccions solen tenir un desenllaç dramàtic (Bartram,WHO,2007).

Tot i així, s'han descrit casos d'infecció de ferida quirúrgica (*Legionella pneumophila*), pericarditis (*Legionella dumoffii*, *Legionella bozemanii*), abscessos (*Legionella cinцинatensis*), endocarditis (*Legionella dumoffii*, *Legionella pneumophila*) o cel·lulitis necròtica (*Legionella micdadei*) amb pneumònia associada o sense [67].

2.7.3. Diagnòstic

Els casos de legionel·losi, segons la Red Nacional de Vigilància Epidemiològica, inclouen tant la LD com la malaltia de Pontiac i es classifiquen en: (i) casos confirmats (clínica compatible i proves de laboratori confirmatòries: aïllament en cultiu, seroconversió per *Legionella pneumophila* sg 1, antigen en orina positiu) o (ii) casos probables (clínica compatible i proves de laboratori presumptives: seroconversió per altres serogrupos de *Legionella*, títol elevat (>1/256) d'anticossos contra *Legionella pneumophila* serogrup 1, observació microscòpica de *Legionella* per immunofluorescència directa en mostres respiratòries).

2.7.3.1. Cultiu

L'aïllament del bacteri en cultiu és encara el mètode de referència i proporciona un diagnòstic de confirmació; a més ens permet estudiar el bacteri: tests de sensibilitat antibiòtica, patogènia i estudis d'epidemiologia. El cultiu es realitza de mostres respiratòries: esput, aspirat bronquial i líquid pleural. En el cas de pneumònia greu s'han d'obtenir mostres respiratòries més invasives mitjançant rentada broncoalveolar. El cultiu és 100% específic i permet detectar qualsevol espècie i serogrup. Però, és poc sensible (variant del 20 al 80% segons tipus de mostra). El principal inconvenient és el temps necessari per donar un resultat que pot anar de 3 dies a 10 dies, tot i utilitzar el medi adequat per al seu aïllament : BCYE α . Si les mostres tenen molta microbiota associada es recomana fer una descontaminació prèvia de la mostra per evitar

creixements inespecífics. Aquesta descontaminació es pot fer amb temperatura (mostra a 50°C durant 30 minuts) o amb pH àcid (mostra a pH 2.2 durant 5 minuts) [24]. La incubació es fa a 35°C -37°C, en una atmosfera aeròbia o amb un 2-3% de diòxid de carboni. Si la mostra és positiva, les colònies comencen a ser visibles a partir del tercer dia.

2.7.3.2. Immunocromatografia (ICT)



Imatge 19: ICT utilitzada per la detecció de *Legionella* en orina.

Aquesta prova diagnòstica es basa en la detecció d'antigen soluble en orina mitjançant la tècnica de immunocromatografia. Si el quadre clínic és compatible sol ser la primera prova diagnòstica que es demana perquè és molt ràpida, sense equipament específic, individualitzada i l'obtenció de la mostra per a dur a terme el test és fàcil i accessible[24].

El que es detecta és un antigen de *Legionella pneumophila* serogrup 1 (tot i que poden haver-hi reaccions creuades amb altres serogrupos) en un temps aproximat de 15-30 minuts. L'antigen detectat és una part del LPS, soluble i es pot detectar des de l'inici de la malaltia i fins mesos després sense afectació per presa d'antibiòtics. La sensibilitat de la

tècnica utilitzant orina concentrada és del 80-90 % i l'especificitat és del 98-100%. El tractament tèrmic de l'orina no afecta les mostres positives però sí que s'ha vist que pot ajudar a evitar falsos positius.

Aquesta tècnica va suposar un gran avantatge diagnòstic ja que permet identificar més casos, més ràpid i el reconeixement de brots en fases inicials podent aplicar mesures preventives de manera immediata. A més, si el cas és confirmat ràpidament, permeten començar el tractament adequat en fases inicials de la pneumònia millorant els pronòstics dels pacients.

2.7.3.3. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)

Aquesta tècnica d'amplificació d'àcids nucleics detecta fragments de DNA de *Legionella* a les mostres analitzades. Les dianes principals per *Legionella* són el gen *mip* (macrophage infectivity potentiator) o el gen 16S del RNA ribosòmic [24]. L'amplificació per PCR ha d'anar d'acompanyada d'un mètode de detecció com la electroforesis o sondes fluorescents. Aquest mètode té com a principal avantatge la rapidesa dels resultats i que, amb el gen 16S, detecta totes les espècies, i com a principal inconvenient el tractament adequat de la mostra per evitar que inhibidors presents (hemoglobina, urea, heparina) puguin donar resultats falsos negatius. En molts casos, les tècniques de PCR disponibles per la detecció de *Legionella* són PCR múltiples que inclouen simultàniament la detecció d'altres agents causals de pneumònia atípica.

2.7.3.4. Serologia

El diagnòstic per serologia inclou tècniques que detecten anticossos específics en mostres de sèrum. La més comúna ha estat la immunofluorescència indirecta (IFI) per detectar anticossos del tipus IgG i/o IgM de *Legionella pneumophila*. Aquesta tècnica utilitza antigens inactivats que estan comercialitzats i prefixats en un portaobjectes al qual s'afegeixen dilucions seriadades del sèrum del pacient. Si la reacció antigen-anticòs es dona, es revelarà amb una antiglobulina humana marcada amb fluorescència i s'observarà al microscopi de fluorescència. La sensibilitat d'aquesta tècnica varia del 80 al 90% i la seva especificitat és del 99%. Per confirmar la seroconversió, la IFI es fa amb mostres en paral·lel del pacient (fase aguda i fase convalescent) i per definició es considera seroconversió: un augment del títol d'anticossos de 4 vegades entre la primera respecte a la segona mostra [24]. Es considera seroconversió positiva si el títol del segon sèrum és $\geq 1/128$ i també es considera que s'ha passat malaltia recent o en temps passats si el títol general és $\geq 1/256$ [24]. Si només s'analitza un sèrum la interpretació dels resultats pot ser problemàtica ja que no es coneix el nivell basal d'anticossos front *Legionella* a la població general. La serologia s'utilitza en la molts dels casos amb finalitats epidemiològiques i poques vegades s'utilitza com a diagnòstic d'infecció aguda.

Encara que avui en dia no està recomanada, una altra tècnica serològica per la detecció de LD és la immunofluorescència directa. Aquest mètode utilitza anticossos fluorescents per detectar qualsevol serogrup de *Legionella pneumophila* en secrecions respiratòries. Els anticossos s'uneixen a la paret bacteriana i es pot observar fluorescència per microscopia directa. La sensibilitat varia del 25 al 75% i l'especificitat és del 95%. Aquest mètode és ràpid i va ser el primer mètode diagnòstic utilitzat. La seva interpretació pot ser problemàtica, ja que un resultat negatiu no descarta la malaltia, i un resultat positiu s'interpreta com un diagnòstic presumptiu.

2.7.4. Sensibilitat antibiòtica natural

Determinar la sensibilitat antibiòtica natural de *Legionella* és difícil per la manca d'un mètode estandarditzat. Els diferents procediments poden portar a diferents resultats i el medi més utilitzat per *Legionella*, BCYE α , afecta a l'activitat d'alguns antibiòtics [68–70]. Utilitzant soques models diferents de *Legionella*, els valors de la concentració mínima inhibidora (MIC) augmenta en alguns casos fins a 5 vegades utilitzant el medi BCYE α . Però malgrat això, el comitè europeu d'antibiogrames, EUCAST, recomana fer els antibiogrames utilitzant Etest en agar BCYE α , per ser el medi adequat pel creixement de *Legionella*, la seva facilitat de manipulació i la facilitat d'interpretació dels resultats (EUCAST Guidance document on *Legionella*, 8 December 2017). A

més a més, encara que l'aïllament de *Legionella* es faci per cultiu moltes vegades l'antibiograma no es realitza. Per aquests motius, no hi ha punts de tall de resistència i s'utilitzen punts de tall epidemiològics per *Legionella*. Aquests punts de tall epidemiològics han estat definits utilitzant les MICs obtingudes en soques 'wild-type' o soques models. Si s'obté una MIC molt més elevada que els punts de tall epidemiològics, es dedueix que la soca té algun mecanisme de resistència. Un altre problemàtica per establir la sensibilitat natural del gènere és la seva localització intracel·lular [71]. Així doncs, que l'antibiòtic tingui una elevada biodisponibilitat, és a dir, bona penetració intracel·lular dins els macròfags, és estrictament necessari per assegurar l'eficàcia de l'antibiòtic. Degut a aquest fet, hi ha discrepàncies entre antibiòtics amb bons resultats *in vitro* però que no són suficientment actius *in vivo* a la realitat [71].

El que si que se sap és que utilitzar β -lactàmics per al tractament de *Legionella*, s'ha d'evitar perquè moltes espècies tenen una β -lactamasa al periplasma [29,72,73]. Aquesta β -lactamasa s'ha descrit com una cefalosporinasa que afecta parcialment a cefotaxima en *Legionella pneumophila* [31] i per tant, no afecta a cefamicines com la cefoxitina i la seva acció es veu inhibida per àcid clavulànic.

Altres resistències naturals que s'han observat en el gènere són la resistència a cloramfenicol de *Legionella fallonii*, o la resistència a eritromicina de *Legionella fallonii*, *Legionella drancourtii* i *Legionella dumoffii* [32].

Les resistències antibiòtiques adquirides a *Legionella pneumophila* són molt poc freqüents. A dia d'avui, només alguns estudis clínics recents han descrit resistència a fluoroquinolones en pacients tractats amb aquests antibiòtics [74] o un únic cas a causa d'una mutació puntual al gen *gyrA* que donava resistència a ciprofloxacina [75].

2.7.5. Tractament

El pronòstic i la recuperació dels pacients amb pneumònia per *Legionella* millora si són tractats adequadament a l'inici de la malaltia. Així doncs, per la seva localització intracel·lular, els antibiòtics utilitzats han de tenir una elevada biodisponibilitat, és a dir, que arribin a unes concentracions citoplasmàtiques suficients dins els macròfags alveolars per a ser eficaços [71]. Per tant, els antibiòtics amb bona penetració intracel·lular inclouen els macròlids, les quinolones, les tetraciclins i la rifampicina. Alguns antibiòtics poden tenir bons resultats *in vitro* però no són efectius *in vivo*. El tractament s'adapta segons el pacient i el diagnòstic. Així doncs, per pneumònia el tractament recomanat és azitromicina 500 mg/dia (via oral) durant 5 dies o claritromicina 500 mg /12 h durant 10 dies. Si la pneumònia és complicada es recomana afegir les fluoroquinolones (ciprofloxacina 400 mg/12 h o levofloxacina 500 mg/dia) o azitromicina 500

mg/dia (via intravenosa) durant 14 dies o poden combinar-se. Com a alternatives tenim doxiciclina 100 mg/12 h (via oral), cotrimoxazole (SXT 800 mg - TMP 160 mg / 12 h) per via oral o qualsevol macròlid amb rifampicina (Mensa et al., 2018).

2.7.6. Tipificació molecular

Els sistemes de tipificació molecular inclouen una gran varietat de tècniques i el seu objectiu principal és comparar el material genètic de dos o més bacteris. La tipificació molecular permet discriminar molt millor si dos soques aïllades estan vinculades epidemiològicament, és a dir, si són microorganismes recentment derivats d'un ancestre o precursor comú. I al mateix temps, discrimina els aïllaments no relacionats encara que pertanyin a la mateixa espècie o soca taxonòmica. Abans aquests estudis tenien en compte propietats fenotípiques, antigèniques, metabòliques o de resistència a antibiòtics però no eren concloents. Això és d'especial importància en el cas de *Legionella* on la tipificació molecular és eina bàsica per establir casos que pertanyin al mateix brot i per discriminar i confirmar la font de transmissió.

Marcador	Tipatge	Reproductibilitat	Discriminació	Tècnica	Interpretació	Cost
Perfil plasmídic	Variable	Regular	Variable	Regular	Bona	Mitjà
REA ADN total	Excel·lent	Variable	Variable	Bona	Regular	Mitjà
Ribotipatge	Excel·lent	Excel·lent	Bona	Bona	Bona	Alt
PFGE	Excel·lent	Excel·lent	Excel·lent	Bona	Bona	Alt
AFLP	Excel·lent	Bona	Excel·lent	Bona	Regular	Alt
MLST	Òptim	Excel·lent	Excel·lent	Difícil	Excel·lent	Alt
SBT	Òptim	Excel·lent	Excel·lent	Difícil	Excel·lent	Alt

Taula 2: Característiques d'alguns dels marcadors moleculars més utilitzats, adaptat de SEIMC (procediments de microbiologia). REA = anàlisi de DNA total amb enzims de restricció d'alta freqüència de tall. PFGE= Digestió de DNA total amb enzims de baixa freqüència de tall i separació de fragments per electroforesis de camp polsant. AFLP= polimorfisme de la mida dels fragments d'amplificació. MLST i SBT= Tipatge per seqüenciació de diferents gens.

2.7.6.1. Electroforesis de camp polsant (PFGE)

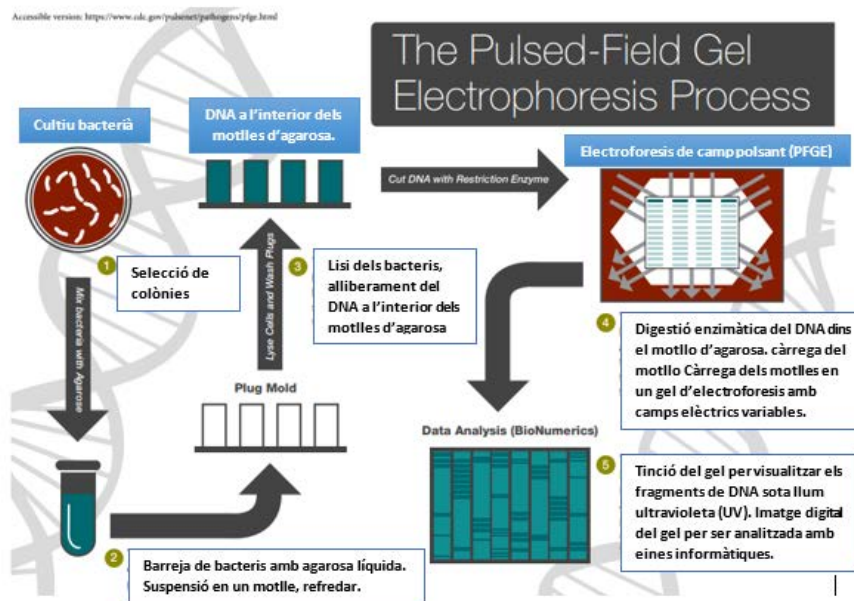
Aquesta tècnica de tipificació molecular va ser descrita al 1984 per Schwartz i Cantor i és actualment encara el 'gold estàndard' per la tipificació epidemiològica de moltes soques (PulseNet, CDC), que incloïa el gènere *Legionella* fins a l'any 2007 però que encara pot ser utilitzada com a 'gold estàndard' sempre i quan no es tracti de *Legionella pneumophila*.

El PFGE és una electroforesi que permet separar molècules de DNA de grans dimensions amb l'aplicació de camps elèctrics alternants a una matriu, generalment, d'agarosa. Aquesta tècnica utilitza la macrorestricció del DNA cromosòmic del bacteri utilitzant enzims amb baixa freqüència de tall. És a dir, les dianes de l'enzim són escasses al DNA cromosòmic bacterià degut

a la seva seqüència i/o longitud. Així doncs, el DNA cromosòmic és tallat en pocs fragments (entre 10 i 30) i alguns són tan grans (més de 40 kb) que no es poden separar per electroforesis convencionals. Per separar aquests grans fragments s'utilitzen electroforesis que varien la seva orientació elèctrica periòdicament. Per evitar el trencament accidental del DNA bacterià per la manipulació inherent a la tècnica i per evitar confusions o patrons que no serien reals, el procediment del PFGE obliga a immobilitzar els bacteris en blocs d'agarosa i és a l'interior d'aquests mateixos, on es durà a terme la digestió enzimàtica amb l'enzim.

Per la interpretació dels resultats i determinar si hi ha relació entre soques s'utilitzen els criteris descrits per Tenover [11].

Aquesta tècnica dóna informació general del cromosoma bacterià, és sensible i discriminativa als canvis recents entre soques, amb una excel·lent reproductibilitat i amb una interpretació fàcil. Per aquest motiu pot detectar variacions en microorganismes aïllats en un període curt de temps. Com a desavantatge, és una tècnica força laboriosa que al utilitzar gels d'agarosa pot presentar petites diferències dins el mateix laboratori.



Imatge 20: Procediment per a realitzar un PFGE, extret de (PulseNet, CDC) i parcialment traduït.

<i>Categoria</i>	Nombre de diferències genètiques en comparació amb la soca model (o soca del brot)	Fragments diferents en comparació amb el patró model (o patró del brot)	Interpretació epidemiològica
<i>Indistingibles</i>	0	0	La soca forma part del brot
<i>Estretament relacionades</i>	1	2-3	La soca probablement forma part del brot
<i>Possiblement relacionades</i>	2	4-6	La soca possiblement formi part del brot
<i>Diferents</i>	≥3	≥7	La soca no és part del brot

Taula 3: Criteris per a la identificació de patrons de PFGE, adaptada de [11].

2.7.6.2. Tipatge basat en seqüències (SBT): Gold Standard

Aquesta tècnica de tipificació molecular és el ‘gold estàndard’ per la tipificació de *Legionella pneumophila* des de 2007 [9,76]. La tècnica amplifica 7 gens de *Legionella* (que a diferència de la tècnica MLST no són ‘housekeeping’) mitjançant PCR. Aquests gens són: *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA* i *neuA/neuAh* [77,78]. Els amplicons es seqüencien i donen un perfil al·lèlic de 7 dígit utilitzant el protocol del SBT descrit per ESCMID Study Group for Legionella Infections (ESGLI o anteriorment, EWGLI) que es troba disponible a la base de dades SBT de l’EWGLI en línia. Aquest perfil al·lèlic, compost de 7 números separats per comes, dona la combinació per trobar el número de la seqüència tipus (ST) associada a la soca estudiada.

Al contrari que el PFGE, el SBT identifica grups poblacionals sense considerar petites variacions cromosòmiques que poden sorgir geogràficament o temporalment, essent possible la seva utilització per tenir una visió a llarg termini. Un dels principals avantatges és la ràpida i fàcil comparació de resultats entre laboratoris. També en utilitzar una base de dades en línia, aquestes es van guardant i es pot fer un seguiment de la distribució global de determinades soques. Però atenent a la seva descripció i característiques, com a desavantatge inherent, trobem que el SBT pot tenir menor poder discriminatiu que el PFGE [79,80], per això el PFGE encara continua sent una tècnica utilitzada en la majoria d’estudis epidemiològics.

2.8. Prevenció

La legionel·losi està considerada com una malaltia que es pot prevenir (evitant o disminuint el de casos) si les mesures per al seu control a l’aigua són eficients.

Des del seu descobriment el 1977, aquest grup de bacteris ha estat ben estudiat establint que per prevenir la LD s’han de tenir en compte dos factors molt importants: el mecanisme de transmissió i el seu nínxol ecològic. Cal remarcar que la presència de *Legionella* en els ambients aquàtics és habitual i que aquest fet no és suficient per considerar-lo perillós per a la Salut Pública. Per aquests motius, aquesta prevenció es fa en dues direccions: (i) controlar

l'eliminació d'aerosols, mecanisme de transmissió principal, evitant zones molt transitades i/o llocs amb persones susceptibles i (ii) evitant a les estructures d'aigua dels edificis condicions que afavoreixin la supervivència i multiplicació de la *Legionella*.

Així doncs per evitar la proliferació del bacteri *Legionella* es recomana: (i) controlar la temperatura, el fet de ser termotolerant aconsella evitar els rangs de temperatura entre 20°C i 45°C en qualsevol circuit d'aigua; (ii) evitar aigua estancada; (iii) evitar la presència de brutícia a l'interior de les instal·lacions; (iv) utilitzar materials que no es degradin fàcilment per evitar la corrosió; (v) controlar les instal·lacions amb mostreigs i anàlisis periòdics i (vi) mantenir un calendari de revisió, neteja i desinfecció de forma periòdica.

En aquest sentit, alguns països europeus tenen la seva normativa o recomanacions per tal de dur a terme la prevenció de colonització i disseminació de *Legionella* a les estructures d'aigua. En el cas de l'estat espanyol la normativa que s'aplica es recull al Real Decreto (RD) 865/2003 de 18 de juliol de 2003 i té en compte les mesures exposades per a la prevenció. A més a més, aquesta normativa especifica que pel manteniment s'ha de (i) conèixer en profunditat la totalitat del circuit amb ajut de plànols i esquemes; (ii) identificar els punts més problemàtics de les instal·lacions (generadors d'aerosols, punts terminals); (iii) tenir un llibre d'incidències a les instal·lacions on es reculli qualsevol problema o avaria; (iv) que el personal de manteniment estigui degudament qualificat i homologat per l'Ordre SCO/317/2003, de 7 de febrer, per la que es regula el procediment per l'homologació dels cursos de formació del personal que realitza operacions de manteniment higiènic-sanitari de les instal·lacions i (v) diferències de control segons el risc i tipus d'instal·lació.

A part del Real Decreto 865/2003 a Espanya també s'apliquen les normatives UNE 100030 IN: Guia per a la prevenció i control de la proliferació i disseminació de *Legionella* a instal·lacions, de setembre de 2005; el Reglament d'instal·lacions tèrmiques d'edificis (RITE), Real Decreto 1751/1998 de 31 de juliol modificat pel Real Decreto 1218/2002 del 22 de novembre, que estableix que la temperatura dels acumuladors sigui de 60°C (mínima de 55°C); el Reglament de seguretat de plantes i instal·lacions frigorífiques, Real Decreto 3099/1977 del 8 de setembre i els Criteris sanitaris de la qualitat de l'aigua de consum, Real Decreto 140/2003 de 7 de febrer. També, en el cas de Catalunya, el Decret 17/2000 de 27 de desembre, pel qual s'estableixen amb caràcter d'urgència les condicions tecnicosanitàries aplicables als aparells i equips de transferència de massa d'aigua en corrent d'aire amb producció d'aerosols per a la prevenció de la legionel·losi i el Decret 352/2004 de 27 de juliol pel qual s'estableixen les condicions higienicosanitàries per a la prevenció i control de la legionel·losi, que demana (i)

informe més detallat i específic de les instal·lacions i el seu manteniment; i (ii) qualsevol modificació del sistema o del manteniment de les instal·lacions hospitalàries s'ha de notificar a la comissió d'infeccioses de cada hospital, formada principalment per microbiòlegs, infectòlegs i infermeres de control d'infecció.

Un punt d'especial importància a prevenir, és la presència de biofilms als sistemes d'aigua, aquests sistemes es poden veure afectats per la corrosió deguda a l'escalfament o hipercloració de l'aigua i formar dipòsits i biocapes a les instal·lacions. D'aquesta manera, la *Legionella* troba un nínxol on estar protegida dels sistemes de control i desinfecció, i favorable per a la seva replicació.

La prevenció de la LD és d'especial importància en hospitals on la concentració de malalts de risc és alta i on hi ha possibles fonts de transmissió per aerosols, a part de les torres de refrigeració, com dutxes o aparells en contacte amb les vies respiratòries. També és especialment important en instal·lacions de risc que es mantenen tancades durant períodes com els hotels de temporada. És important tenir en compte que es pot beure, cuinar i utilitzar per a la higiene l'aigua potable d'abastament públic sense perill a l'àmbit privat i inclús a fonts públiques.

Les mesures de prevenció efectives són les que contemplen un bon disseny de les instal·lacions i la neteja, desinfecció i correcte manteniment, especialment en zones sensibles on el bacteri es pugui allotjar, per exemple per estancament d'aigua.

Les mesures preventives front legionel·losi per a l'aigua per al consum humà descrites al RD 865/2003 són:

- Garantir la correcta circulació de l'aigua evitant estancaments
- Utilitzar sistemes de filtració (UNE-EN 13443-1)
- Fàcil accessibilitat als sistemes per : inspecció, neteja, presa de mostres.
- Materials en contacte amb l'aigua capaços de resistir desinfeccions amb grans concentracions de clor o altes temperatures i que evitin la formació de biofilms i creixement bacterià.
- Temperatura de l'aigua freda per consum humà el més baixa possible, inferior a 20 °C quan el clima ho permeti i aïllades tèrmicament o lluny de circuits d'aigua calenta.
- Els dipòsits d'aigua freda per consum humà hauran de tenir una tapa impermeable i aïllar-se tèrmicament quan estiguin a l'exterior, si utilitzen clor com a desinfectant, aquest serà afegit per dosificadors automàtics.
- Als acumuladors d'aigua calenta la temperatura s'haurà de mantenir homogènia i evitar el seu refredament.

- Sistema de vàlvules de retenció (UNE-EN-1717) que evitin retorns d'aigua per pèrdua de pressió i evitar barreja d'aigua de diferents circuits.
- El sistema d'aigua calenta podrà permetre que les temperatures arribin a 70 °C i que es mantinguin per sobre dels 50°C, als punts terminals i a la canonada de retorn a l'acumulador.

Per prevenir l'aparició de *Legionella* i altres patògens es fa un tractament de desinfecció en continu del sistema. Aquesta mesura no és del tot efectiva si no va acompanyada d'una neteja periòdica del sistema i de revisions de funcionament. Si els controls de *Legionella* a l'aigua són positius es dur a terme un tractament de xoc, i si apareix algun cas es fa una desinfecció per brot, aquestes desinfeccions solen ser més agressives amb l'objectiu d'eliminar el bacteri. Els principals tractaments de prevenció de patògens a l'aigua de consum són (i) tractament químic, normalment amb biocides oxidants com el clor i els seus derivats; (ii) tractament tèrmic i (iii) radiació amb llum ultraviolada.

Instal·lacions amb risc de transmissió de <i>Legionella</i> (RD 865/2003)		
Alt risc	Baix risc	Risc per teràpia respiratòria
<ul style="list-style-type: none"> -Torres de refrigeració i condensadors evaporatius -Circuits d'aigua calenta sanitària amb recirculació i acumuladors -Circuits d'aigua climatitzada amb recirculació com banyeres d'hidromassatge o piscines d'ús públic -Centrals industrials d'humidificació 	<ul style="list-style-type: none"> -Circuits d'aigua calenta sanitària sense retorn i instal·lacions d'aigua freda de consum humà - Sistemes que polvoritzin aigua (que no es considerin d'alt risc) <ul style="list-style-type: none"> -Humectants -Fonts ornamentals - Sistemes d'aspersió urbans -Sistemes d'aigua contra incendis -Sistemes d'aerosols per a la refrigeració a l'aire lliure -Altres sistemes que puguin crear aerosols o acumulin aigua 	<ul style="list-style-type: none"> -Equips de teràpia respiratòria -Respiradors -Nebulitzadors -Altres aparells mèdics en contacte amb les vies respiratòries

Taula 4: Àmbit d'aplicació del Real Decret 865/2003

Mètode de desinfecció	Avantatges	Desavantatges
Temperatura ≤ 20°C	Simple, efectiu, fàcil de monitoritzar	Només aplicable a sistemes d'aigua potable
Temperatura ≥ 50°C	Simple, efectiu, fàcil de monitoritzar	No elimina <i>Legionella</i> Necessita protecció per escalfament dels sistemes Temperatura de circulació prop de 60°C Dificultat de mantenir les temperatures als edificis antics
Hipoclorit de sodi	Simple, eficaç i de baix cost	Formació de trihalometans Tòxic per a peixos Protecció en pacients amb diàlisi Afecta al gust i olor de l'aigua Inestable a temperatures elevades Incrementa la corrosió de coure
Monocloramines	Simple, eficaç contra biofilms, grans sistemes d'aigua	No dosificació en sistemes d'aigua petits Tòxic per a peixos Protecció en pacients amb diàlisi Afecta a components fets de goma
Diòxid de clor	Simple i efectiu	Formació de clorit Protecció en pacients amb diàlisi Mesures de seguretat
Ionització coure-plata	Efectiu quan les concentracions recomanades són mantingudes	Monitorització de coure-plata Es necessita pretractament Concentracions més altes de coure i plata a l'aigua
Raigs ultraviolats	Simple i efectiu	No afecta a biofilms No és efectiu en aigües tèrboles Efectiu només als punts d'aplicació
Ultrafiltració al punt d'entrada	Barrera física Eliminació efectiva de partícules i biomassa	No inactiva <i>Legionella</i> al sistema Es desconeix el seu paper en la formació de biofilms
Filtres al punt d'ús	Barrera física (sistemes d'aigua calenta i freda) Gran utilitat en edificis amb pacients d'alt risc Fàcils d'instal·lar	Cost elevat Canvi regular Només útils als punts d'ús
Biocides no oxidants	Eficaç en torres de refrigeració	Sistemes d'aigua no potable Utilització de dos biocides diferents Difícil de neutralitzar i de monitoritzar

Taula 5: Principals avantatges i desavantatges dels mètodes de desinfecció més comuns front *Legionella*. Font: Tíscar Graells, adaptat de (Bartram,WHO,2007).

2.8.1. Control d'instal·lacions

Per controlar la quantitat de *Legionella* a les instal·lacions es fa una anàlisi microbiològica de les mostres d'aigua dels diferents punts de totes les instal·lacions considerades al Real Decreto 865/2003. La tècnica 'gold- estàndard' per a l'anàlisi microbiològic és el cultiu i es realitza seguint la normativa estandarditzada ISO 11731:2017 'Water Quality - Enumeration of *Legionella*'. Segons els recomptes del cultiu, i si és necessari, s'han d'aplicar mètodes de tractament adequats o canvis en els circuits d'aigua per disminuir la concentració de *Legionella* a l'aigua.

CFU/L	Mesures correctores
>100 fins <1.000	Revisar programa de manteniment. Mesures correctores de les instal·lacions. Mostreig en 15 dies.
>1.000 fins <10.000	Revisar programa de manteniment. Mesures correctores de les instal·lacions. Neteja i desinfecció d'acord a l'annex 4B del Real Decreto 865/2003. Mostreig en 15 dies.
>10.000	Parada i tancament de les instal·lacions. Neteja i desinfecció d'acord a l'annex 4C del Real Decreto 865/2003. Mostreig en 15 dies.

Taula 6: Mesures correctores a aplicar segons els resultats del cultiu microbiològic (ISO 11731:2017) de *Legionella*.

A més a més, en determinades instal·lacions, com a les torres de refrigeració, també s'ha de fer a part un recompte de bacteris aerobis totals seguint l'ISO 6222:1999 'Water quality – Enumeration of culturable microorganisms – Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium'. Aquesta anàlisi pretén analitzar l'eficàcia dels biocides utilitzats a les instal·lacions. Si aquest recompte supera les 10.000 CFU/mL es dedueix que el biocida utilitzat no està actuant correctament i s'han de prendre mesures adients, independentment dels resultats de les anàlisis de *Legionella*.

Així i tot, en els darrers anys, les tècniques moleculars per detectar *Legionella* en mostres ambientals estan agafant força principalment perquè el temps de resposta és inferior. Especialment, podem parlar de PCR quantitativa però, en estudis ambientals, la interpretació d'aquests resultats pot ser complicada [81,82].

2.8.2. Bases microbiològiques de la resistència de *Legionella* als mètodes de desinfecció

Els hostes naturals de *Legionella*, com les FLA són un reservori del patogen i el seu medi intracel·lular els proporciona protecció i un nínxol replicatiu favorable [44,46,51]. Aquesta protecció augmenta la resistència de *Legionella* front biocides, àcid, antibiòtics, temperatura i estrès osmòtic [26]. Però aquesta protecció no només es dona quan la FLA està en forma de trofozoït, sinó també en forma de cists. Tot i que els cists madurs no solen ser infectats per *Legionella*, les FLA a l'enquistar-se els hi donen una protecció extra [51]. Així doncs, els seus hostes en forma de cists els protegeixen front els procediments de desinfecció d'aigua [44,83] en una relació recíproca ja que també l'hoste té més possibilitats de sobreviure[44]. Alguns cists són viables després de tractaments amb clor (o derivats) a raó de 100 ppm durant 10 minuts o després d'estar a 80 °C, indicant que les mesures preventives actuals poden ser insuficients per

controlar *Legionella* i la seva interacció amb FLA [84]. Com a conseqüència, *Legionella* es troba habitualment als sistemes de distribució d'aigua i a l'aigua potable [24,44].

Un altre punt clau per la persistència de *Legionella* són els biofilms. Tot i un bon manteniment de les instal·lacions, els biofilms estan presents en la majoria de sistemes d'aigua i és difícil evitar la seva formació. Com a conseqüència, qualsevol modificació del biofilm pot fer que algunes *Legionella* associades a ell es puguin alliberar de nou a l'aigua i començar un altre cicle i una nova colonització [53]. Per evitar que passi això cal que s'utilitzin mètodes de desinfecció químics, físics i de temperatura encara que no siguin suficients per a l'eliminació total del bacteri. *Legionella* associades al biofilm són extremadament resistents als biocides, desinfectants i temperatura [57].

A més a més, l'exposició a biocides pot fer que els bacteris entrin a l'estat de VBNC.

2.8.3. Estudi de brots

Es defineix com a brot dos o més casos relacionats epidemiològicament en una àrea propera i que, possiblement, tenen risc d'origen ambiental comú. L'estudi d'un brot té com a objectiu trobar i identificar la possible font de transmissió de la *Legionella* en el menor temps possible per aplicar les mesures corresponents i evitar més infeccions relacionades.

Davant la sospita de brot es crea un grup de treball que inclou de forma ideal metges relacionats amb els pacients diagnosticats, microbiòlegs clínics i ambientals, infectòlegs, així com, personal de vigilància epidemiològica de la zona i Salut Pública. Aquest grup de treball ha de fer un estudi epidemiològic dels pacients (rutina, llocs visitats, activitats durant el període d'incubació, històries clíniques dels pacients) per intentar trobar l'origen de transmissió i amb aquesta informació s'estableixen les zones a estudiar. L'estudi ambiental es fa en les zones geogràfiques on els pacients han pogut contraure la malaltia, es revisen els documents de les instal·lacions dins d'aquest perímetre per establir les fonts possibles i es prenen mesures excepcionals per evitar que s'escapi cap diagnòstic de LD. A partir d'aquí, es formula una hipòtesi de llocs més probables i s'agafen mostres de les fonts incloses el més aviat possible. Segons aquests estudis, i sense comprovar encara la hipòtesi, es realitzen mesures preventives de les instal·lacions que, bàsicament, inclouen: neteja, desinfecció i reparacions estructurals per intentar parar el brot i l'aparició de casos. Si es confirma la font, s'hauran de prendre les mesures necessàries a llarg termini per evitar que pugui repetir-se la situació.

Legionella pneumophila serogrup 1 és la predominant en casos clínics, així doncs només l'espècie i serogrup, no són suficients per establir la font. En aquest sentit, s'han de realitzar

estudis epidemiològics moleculars per relacionar les soques aïllades clíniques i ambientals, i aquestes dues han de ser coincidents.

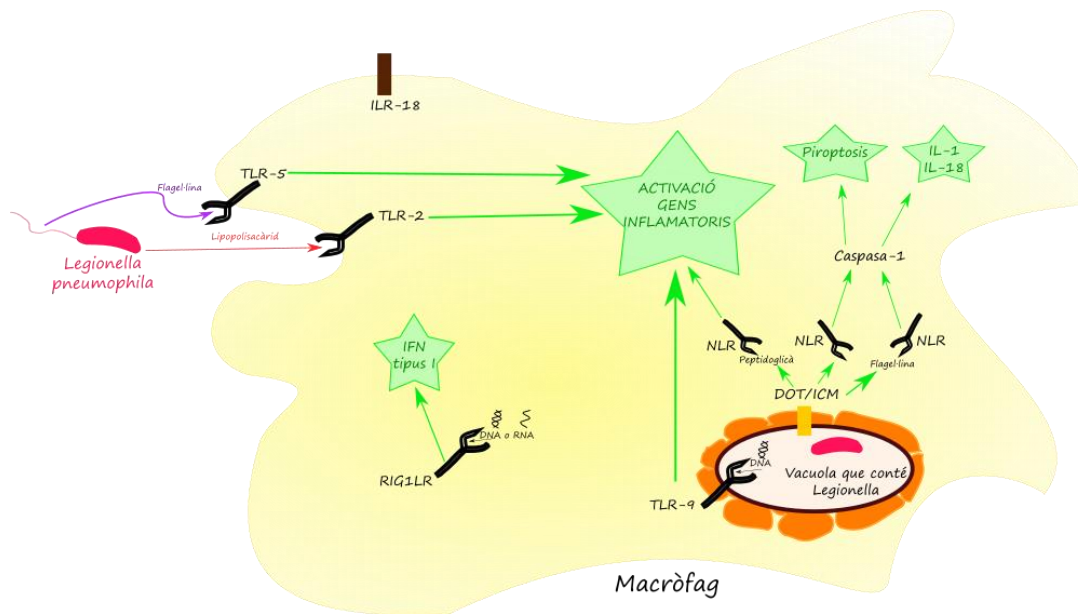
Quan el brot es dona per acabat, clínicament, es recomana que es redacti un informe que inclogui tots els aspectes de la investigació. Tot i que els àmbits d'aparició del brot poden ser diversos: hospitalaris, comunitaris, relacionats amb el viatger; els mètodes per estudiar-los acostumen a tenir el mateix procediment.

2.9. Immunitat

La primera barrera d'entrada de patògens al tracte respiratori és l'epiteli ciliar que amb el seu moviment intenta fer fora els microorganismes que puguin arribar. Aquesta activitat es veu afectada pel tabac, la malaltia pulmonar obstructiva crònica, entre altres; fet que podria ser una de les causes de la susceptibilitat més gran a la malaltia en aquests grups.

Un cop la *Legionella* arriba als alvèols pulmonars, les cèl·lules implicades en la immunitat innata són cèl·lules dendrítiques, macròfags i cèl·lules Natural-Killer (NK). Aquestes cèl·lules reconeixen uns patrons moleculars associats a patògens o PAMP com el lipopolisacàrid, el peptidoglicà o la flagel·lina a través de receptors de reconeixement de patrons (PRR) [10]. D'aquesta manera el reconeixement del receptor, PRR, amb el lligand, PAMP, activa una via de senyalització en cascada que activa la resposta inflamatòria. Aquests PRR inclouen receptors de membrana Toll-Like receptors (TLR) i receptors citoplasmàtics com RIG1-like receptors (RIG1LR) o Nod-Like Receptors (NLR) que. Els TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6, TLR-10 i TLR-11 es troben a la membrana extracel·lular i els TLR-3, TLR-7, TLR-8 i TLR-9 a les membranes intracel·lulars.

El cas més ben estudiat és el cas de *Legionella pneumophila* i els macròfags. Diferents cèl·lules del sistema immune (cèl·lules dendrítiques, neutròfils i macròfags) reconeixen els PAMP i fagociten *Legionella* [8]. En el cas del macròfag, el TLR-2 reconeix el LPS (que també pot ser reconegut pel TLR-4 [8]), els NLR reconeixen el peptidoglicà, el TLR-5 i NLR reconeixen la flagel·lina i el TLR-9 reconeix DNA bacterià. Tots ells actuen activant la cascada de senyalització cel·lular per a la producció de substàncies inflamatòries: citocines i quimiocines [10]. El RIG1LR es troba al citoplasma i reconeix àcids nucleics de *Legionella* activant la producció de interferons (IFN) tipus I [10]. Els NLR també activen la via de la caspasa-1 a la cèl·lula induint la formació de porus a la membrana i la mort cel·lular (procés anomenat piroptosis) o, a través de la caspasa-1, la producció d'interleucines (IL) inflamatòries com la IL-1 que ajuda a la resposta innata de fase aguda i la IL-18 [10] que atrauen a cèl·lules NK. Aquestes últimes augmenten la producció de IFN γ i factor de necrosi tumoral α (TNF α).



Imatge 21: Resposta innata en un macròfag infectat per *Legionella pneumophila*. Font: Tíscar Graells, adaptat i simplificat de [10]. ILR18= Receptor de interleucina 18, TLR-5= Toll-like receptor 5, TLR-2= Toll-like receptor 2, TLR9= Toll-like receptor 9, NLR= Nod-like receptor, RIG1LR= RIG-1-like receptor, IL-1=interleucina 1 i IL-18 =interleucina18.

Així doncs, les cèl·lules fagocítiques (dendrítiques i macròfags) i les cèl·lules NK activen rutes de senyalització per restringir la multiplicació bacteriana i controlar la infecció a través de molècules com les citocines i quimiocines. Aquestes molècules estimulen a cèl·lules presentadores d'antigen i atrauen a més cèl·lules al lloc de la infecció. Com a conseqüència, l'estimulació de cèl·lules presentadores d'antigen portarà a una resposta immune adquirida i específica que podria protegir de possibles reinfeccions [10].

Alguns estudis apunten que la susceptibilitat a la malaltia en determinats grups de la població (immunodeprimits, gent gran) pot estar afectada per la producció de IFN γ . Si no hi ha producció suficient, la reacció inflamatòria aguda no és suficient i la malaltia és més probable [26] o per un polimorfisme en el TLR-5 (present a un 10% de la població que introdueix un codó STOP prematur; TLR-5^{329STOP}) que no reconeix bé la flagel·lina i no indueix una resposta inflamatòria adequada [26].

La destrucció de macròfags, les lesions de l'epiteli respiratori i la reacció inflamatòria intersticial fa que arribin al lloc de la infecció cèl·lules polimorfonuclears i monòcits. Com a conseqüència, es genera una pneumonitis amb un exsudat molt ric en fibrina, i fins i tot, lesions pulmonars i abscessos [85].

2.10. Estudis metagenòmics

Els microorganismes que coneixem avui en dia són només una petita part de la diversitat microbiana total. Normalment coneixem a aquells microorganismes que, o bé creixen en medis de cultiu convencionals al laboratori, o bé tenen algun interès econòmic o que afecti a la societat (producció de menjar i begudes, aplicacions biotecnològiques, patògens). Però, la gran majoria de bacteris, amb una estimació per sobre el 98%, no poden ser cultivats o les condicions perquè puguin créixer en condicions de laboratori no són conegudes [86].

Així doncs, si volem estudiar realment la diversitat microbiana necessitem tècniques que siguin independents del cultiu com les tècniques metagenòmiques. La majoria d'estudis de diversitat microbiana independents de cultiu utilitzen una anàlisi del gen RNA ribosòmic 16S. Aquest gen s'utilitza perquè (i) és un gen universal present en tots els microorganismes, (ii) és resistent a la HGT, (iii) té segments que són variables i (iv) té segments que són constants.

S'utilitzen uns encebadors universals per amplificar una part d'aquest gen de totes les espècies presents a la mostra o mostres analitzades. El resultat final és una col·lecció d'amplicons que es creu representativa en diversitat i quantitat de la mostra original. La seqüenciació d'aquests amplicons ens dona les cadenes de DNA que han de ser comparades amb una base de dades per determinar a quin microorganisme pertanyen. A partir d'aquestes seqüències, s'identifiquen regions de similitud i regions amb diferències, utilitzant una disposició especial: l'alineament. L'alineament òptim és aquell que minimitza el nombre de substitucions, insercions o supressions i les cadenes s'acostumen a representar com files d'una taula de manera que cada columna representa punts de l'evolució d'una mateixa posició del genoma.

Si la seqüència no es troba exactament a la base de dades, es classifica utilitzant l'aproximació de l'últim ancestre comú. Aquesta aproximació es basa en la semblança dels mecanismes moleculars dels organismes que suggereix fortament que tots els organismes de la Terra tenen un ancestre comú, de manera que qualsevol conjunt d'espècies està relacionat evolutivament.

Aquestes relacions s'anomenen relacions filogenètiques i es representen mitjançant un arbre filogenètic. La recerca filogenètica ha anat desenvolupant-se exponencialment en els últims anys gràcies a la recerca estadística, algorítmica i, sobretot, computacional. El principal objectiu és deduir aquests arbres a partir dels organismes existents i depèn fortament de la identificació de caràcters homòlegs entre un conjunt de tàxons.

Aquestes tècniques són importants per estudiar la gran quantitat de microorganismes presents a la natura, i especialment, el cas de bacteris intracel·lulars com *Legionella*.

3. Justificació de la tesi

La legionel·losi és una malaltia de gran importància a Salut Pública, especialment, perquè és una malaltia que es pot prevenir. La perspectiva ecològica i de l'ambient per al control i el monitoratge de la concentració bacteriana als sistemes d'aigua és molt important per millorar les mesures preventives i evitar futurs brots.

Actualment el mètode de detecció de *Legionella* requereix més d'una setmana per obtenir resultats, i es necessita personal qualificat per a realitzar-los. No hi ha un monitoratge real i el control dona la concentració de *Legionella* en un moment puntual en el temps, el moment de presa de la mostra, i pot ser diferent de la situació actual.



CLIVET

proto

catlab

Metrohm
Applikon

UPPSALA
UNIVERSITET

A.R.C.
Applied Research Center

Imatge 22: Logo del projecte Poseidon dins el marc europeu Horizon 2020 i de les 6 institucions que participaven en la recerca.

D'aquesta manera, amb la idea de poder monitorar la concentració del bacteri d'una manera ràpida, a temps real, automatitzada i amb baix cost en sistemes d'aigua va néixer el projecte europeu Poseidon (número de

projecte: 644669) dins el Marc de Recerca i Innovació Horizon 2020. Que incloïa 6 grups de treball o recerca, entre ells CATLAB i la Universitat d'Uppsala, de 4 països diferents: Espanya, Suècia, Itàlia i Holanda.

Aquest projecte, de recerca amb durada de gener 2015 - gener 2018, pretenia fer un biosensor per poder monitorar la concentració de *Legionella in situ* als sistemes d'aigua utilitzant la tècnica SPR (Surface-Plasmon-Resonance).

A partir de les mostres disponibles per a validar el prototip de biosensor, les quals eren analitzades seguint la normativa ISO 11731:2007, va sorgir la idea de fer un estudi epidemiològic a l'ambient i estudiar diferents aspectes del gènere *Legionella* per tal de fer un estudi en més profunditat: colonitzacions de sistemes artificials d'aigua, sensibilitat antimicrobiana i prevalença als sistemes naturals.

4. Objectius

Per dur a terme una bona prevenció de les malalties causades per *Legionella*, encara cal estudiar en profunditat més aspectes per acabar de comprendre tots els mecanismes disponibles al nostre abast. L'objectiu general d'aquesta tesi ha inclòs estudiar les dues branques de la microbiologia involucrades amb el bacteri. La microbiologia clínica, per una banda, i la microbiologia ambiental, per l'altra. Així doncs es van proposar dos estudis, explicats en els següents apartats, per intentar aclarir alguns aspectes bàsics de l'ecologia i les característiques del bacteri.

4.1. Objectius específics article I: *Legionella pneumophila* recurrently isolated in a Spanish hospital: Two years of antimicrobial resistance surveillance

Els sistemes d'aigua d'edificis d'alt risc com els hospitals s'han vist colonitzats per *Legionella* en moltes ocasions. Els patrons antimicrobians de *Legionella* no estan ben estudiats i no tenen punts de tall. A més els hospitals són ambients que poden presentar concentracions d'antibiòtics per sota de la MIC i aquesta pressió selectiva pot seleccionar soques ambientals amb mecanismes de resistència. Un altre factor important a *Legionella* és l'elevada taxa de HGT que pot transferir, entre altres, gens de resistència a antibiòtics.

Els objectius d'aquest article són:

- Estudiar les soques aïllades durant un període de dos anys en un dels hospitals gestionats per CATLAB.
- Analitzar els patrons antimicrobians dels antibiòtics més comunament prescrits en infeccions respiratòries a les soques ambientals hospitalàries aïllades.
- Analitzar els possibles canvis en aquests patrons, en el cas que hi fossin, per intentar predir resistències a l'ambient abans que es trobin en aïllats clínics.

4.2.Objectius específics article II: The all-intracellular order *Legionellales* is unexpectedly diverse, globally distributed and lowly abundant

Legionella pertany a la família *Legionellaceae* de l'ordre *Legionellales* de les Gammaproteobacteria. L'altra família inclosa a l'ordre és la família *Coxiellaceae* que inclou diferents gèneres i un altre patògen ben conegut en el món clínic: *Coxiella burnetii*. Aquest ordre està format per bacteris intracel·lulars que tenen en comú el T4BSS, un sistema que injecta proteïnes efectores dins la cèl·lula i que altera les funcions de l'hoste en detriment del bacteri. La diversitat de l'ordre sembla gran aïllant-se de llocs molt diferents, des de climes freds de l'Àrtic fins a aigües termals per sobre dels 50°C. Però tot i així, han estat relativament poc rellevants fins al descobriment de *Legionella pneumophila* a l'any 1976.

Els objectius d'aquest article són:

- Estudiar la distribució geogràfica i la prevalença de l'ordre en diferents ecosistemes.
- Entendre l'ecologia global d'aquest ordre i identificar mecanismes que puguin afectar la diversitat bacteriana.
- Veure la influència de la temperatura en les poblacions bacterianes d'aquest ordre que, com a conseqüència, podria predir els efectes ambientals causats pel canvi climàtic.

5. Resultats

Els articles que formen part d'aquesta tesi són els següents:

5.1. Article I: *Legionella pneumophila* recurrently isolated in a Spanish hospital: Two years of antimicrobial resistance surveillance

Tiscar Graells, Marta Hernández-García, Josefa Pérez-Jové, Lionel Guy, Emma Padilla. *Legionella pneumophila* recurrently isolated in a Spanish hospital: Two years of antimicrobial resistance surveillance. *Environ Res. Elsevier Inc.*; 2018;166: 638–646.

doi: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.06.045>

Introducció: *Legionella* és un microorganisme que colonitza sistemes d'aigua artificials i que pot causar pneumònia. La persistència del gènere *Legionella* va ser estudiada en el sistema d'aigua d'un hospital així com els patrons antimicrobians de les soques aïllades.

Mètodes: Es varen analitzar mostres d'aigua seguint la ISO 11731:2007 per aïllar *Legionella* de diferents punts de l'hospital estudiat. Les soques aïllades van ser identificades per serologia i per espectrometria de masses (MALDI-ToF). El tipatge molecular es va fer utilitzant electroforesis de camp polsant (PFGE) i tipatge basat en seqüències (SBT). La sensibilitat antibiòtica es va determinar utilitzant les tècniques d'ETEST® i disc-difusió.

Resultats: *Legionella pneumophila* va ser aïllada recurrentment durant tot el període. Totes les soques pertanyien al mateix grup: *Legionella pneumophila* sg 2-14 amb seqüència tipus ST328. Tot i així, el PFGE va revelar 5 patrons diferents. Independentment del mètode utilitzat, no es va observar cap canvi en els patrons antimicrobians de les soques analitzades.

Conclusions: Tot i el compliment de la normativa, la colonització per part del gènere *Legionella* encara és un problema en els sistemes d'aigua d'edificis d'alt risc com els hospitals. La soca aïllada, *Legionella pneumophila* sg 2-14 ST328, podria no ser detectada per la immunocromatografia en orina utilitzada en el diagnòstic de rutina. L'estudi dels patrons antimicrobians de patògens amb origen ambiental, i difícils d'aïllar en mostres clíniques, pot ajudar a predir possibles resistències abans que aquestes es trobin en soques clíniques.

5.2. Article II: The all-intracellular order *Legionellales* is unexpectedly diverse, globally distributed and lowly abundant

Tiscar Graells, Helena Ishak, Madeleine Larsson, Lionel Guy. The all-intracellular order *Legionellales* is unexpectedly diverse, globally distributed and lowly abundant.

FEMS Microbiology Ecology (accepted manuscript on 6th September 2018).

Published: 10th September 2018

doi: <https://doi.org/10.1093/femsle/fiy185>

Introducció: *Legionellales* és un ordre de bacteris intracel·lulars que inclou patògens accidentals per als humans com: *Legionella pneumophila* i *Coxiella burnetii*. Tot i la diversitat de l'ordre, se sap poc de la seva distribució i abundància als diferents ecosistemes. Només uns quants gèneres han estat estudiats i seqüenciats, a conseqüència de les dificultats de fer créixer bacteris intracel·lulars en medi de cultiu.

Mètodes: Es varen analitzar amplicons dels gens ribosòmics 16/18S van ser analitzats per determinar la diversitat, ubiqüitat i abundància de l'ordre *Legionellales* a partir de mostres recollides en reserves naturals, en una mina a Suècia i a partir de les dades d'estudis públics disponibles.

Resultats: L'ordre *Legionellales* és altament divers i encara hi ha molts gèneres sense identificar. A més, està distribuït globalment, i és ubic en la majoria de sistemes artificials i està present en la meitat de mostres d'aigua naturals. Així i tot, l'abundància de l'ordre en les mostres és molt baixa .

Conclusions: L'ordre *Legionellales* és un ordre poc abundant, divers i ubic a la natura, tant geogràficament com en diferents ecosistemes. Per tal d'estudiar el paper d'aquests bacteris a la natura, la seva diversitat i el seu paper en l'ecologia són necessàries tècniques metagenòmiques que no estiguin limitades per la capacitat de certs microorganismes de créixer en cultiu i que puguin contemplar els diferents estils de vida que hi ha a la natura.

6. Discussió general

El gènere *Legionella* va passar desapercebut dins la societat fins el brot de pneumònia a Philadelphia (Estats Units) el 1976. Un cop descobert i aïllat l'agent causal del brot, diferents estudis i investigacions es van dur a terme per intentar caracteritzar-lo. Aquests estudis continuen i encara queda molt per saber d'aquests bacteris, especialment, a conseqüència de la seva complexa ecologia a la natura.

L'aïllament i la confirmació del gènere *Legionella* es fa seguint la normativa ISO 11731:2007. Aquest protocol és el 'gold estàndard' per la detecció de legionel·la en mostres ambientals però necessita fins a 10 dies per obtenir resultats. Durant el període estudiat en el nostre hospital, *Legionella pneumophila* ST328 va ser aïllada de diferents mostres d'aigua tant en ubicació com en temps. Encara que totes les normatives i mesures preventives van ser seguides i aplicades rigorosament, la mateixa soca va continuar aïllant-se en tot el període. Aquest fet demostra que les mesures utilitzades a dia d'avui no són suficientment efectives per mantenir una bona pràctica preventiva front la legionel·losi. Aquesta situació és especialment important en hospitals com l'anàlitzat, ja que, molts pacients estan immunodeprimits o en un estadi de vulnerabilitat immunològica que els fan possibles candidats de patir la malaltia [9,87]. A més a més, el personal d'edificis com els hospitals poden estar contínuament exposats al bacteri.

L'antigen O del LPS del gènere *Legionella* s'utilitza tradicionalment per determinar serogrups i subgrups dins d'aquests primers en una mateixa espècie. Curiosament, en les mostres ambientals analitzades només varen ser aïllades *Legionella pneumophila* sg 2-14. L'espècie i serogrup que notifica més casos és *Legionella pneumophila* sg1 però aquest serogrup no va ser aïllat en cap moment del nostre estudi. Així, aquest serogrup no ha sigut el predominant en mostres d'aigua i altres autors han obtingut resultats similars [68,69]. Les soques més comunament aïllades a l'ambient no han de ser necessàriament les soques més aïllades de mostres clíniques, observant-se discrepàncies.

Generalment, l'alt percentatge de casos clínics causats per *Legionella pneumophila* sg 1 no es veu reflectit en la distribució ambiental del gènere. La clara prevalença clínica de *Legionella pneumophila* sg 1 contrasta amb estudis de seroprevalença que demostren la potencial exposició de la població a diferents serogrups i espècies de legionel·la [9]. D'aquesta manera la caracterització dels factors de virulència de *Legionella pneumophila* serogrup 1 ha esdevingut un dels principals camps de recerca del gènere. L'antigen O del LPS de *Legionella pneumophila* serogrup 1 pot tenir un epítot sintetitzat pel gen Lag-1, que és reconegut per anticossos

monoclonals Mab2 o Mab3/1. Aquest sol serogrup amb el genotip Lag-1 és el responsable de la majoria de casos clínics de LD [9], però en canvi, no s'aïlla habitualment en mostres d'aigua.

En el període estudiat a l'hospital, un cas clínic de LD va ser diagnosticat mitjançant la immunocromatografia en orina. El cultiu també va ser positiu, tot i que, l'aïllament de legionel·la en mostres clíniques no es fàcil, ja que, a més del temps necessari per al seu creixement, moltes vegades es necessiten mostres invasives del tracte respiratori inferior. Tot i això un cop aïllada, es va realitzar la prova confirmatòria utilitzant el cultiu en medi amb i sense L-cisteïna. Aquesta prova inicial podria ser substituïda per la tècnica MALDI-ToF, que és molt més ràpida, fàcil de realitzar i podria ser decisiva per a donar un bon tractament al pacient. D'aquesta manera, el MALDI-ToF podria ajudar a un diagnòstic inicial més ràpid si es té l'equip [88].

Molts hospitals, inclòs el nostre, fan el cribratge per LD utilitzant la immunocromatografia en orina que només detecta *Legionella pneumophila* sg 1 (tot i que poden haver reaccions creuades amb altres serogrupos) [9]. Així doncs, el percentatge dels casos de legionel·losi podria estar esbiaixat. Es parla de més del 84% dels casos causats per *Legionella pneumophila* sg 1 [26], però els percentatges reals podrien ser més baixos ja que els serogrupos més predominants en mostres ambientals no estan sent considerats. Aquest cribratge s'hauria de reconsiderar ja que es podria diagnosticar una pneumònia sense considerar la opció de que fos una LD. Actualment, molts casos de pneumònia no tenen identificat un agent causal o no està clar. Els pacients reben tractament empíric i podria no ser el més adient.

Si parlem de les tècniques de tipificació molecular, el PFGE és altament discriminatiu i sensible a variacions petites i recent en el genoma de les soques a estudiar. En canvi, el SBT identifica grans grups poblacionals sense tenir en compte petites variacions cromosòmiques que poden sorgir en el temps o en l'espai i és l'estàndard pel tipatge de *Legionella pneumophila* [9,76]. Així, també, es veu reflectit en els resultats obtinguts: totes les nostres soques pertanyien al mateix ST, el ST328, mentre que el PFGE mostrava 5 patrons diferents però estretament relacionats entre ells. Aquest fet demostra el gran poder discriminatiu del PFGE [79,80] i fa patent el perquè és una tècnica utilitzada encara en estudis epidemiològics, especialment quan es tracta de relacionar soques ambientals i clíniques en un brot.

Els tests de sensibilitat antibiòtica de *Legionella pneumophila* no tenen un protocol estàndard. La influència del medi i el mètode utilitzat fa que els resultats de les MIC puguin ser molt diferents. El medi d'aïllament del gènere *Legionella* conté carbó que inhibeix l'acció d'antibiòtics com les fluoroquinolones, macròlids, rifampicina, doxiciclina i cotrimoxazol [68,70]. Per tant, les MIC *in vivo* podrien ser més baixes en *Legionella pneumophila* que les observades en l'ETEST.

Però, el medi BCYE α continua sent el medi d'elecció, tot i la inhibició causada pel carbó que conté, ja que el bacteri creix òptimament i altres medis poden necessitar un inòcul molt més alt per a obtenir un creixement similar o simplement no tenir creixement[89]. Aquest medi i la tècnica d'ETEST és el que es recomana per als tests de sensibilitat antibiòtica ja que la lectura dels punts de tall de la MIC és relativament fàcil [90]. Tot i no haver un protocol estàndard, EUCAST ha redactat un document guia que només considera la tècnica d'ETEST per determinar les MIC (Guidance document on *Legionella*, EUCAST,2017). El nostre estudi es va dissenyar abans de la publicació d'aquest document i les tècniques de disc-difusió també van ser realitzades, però seguint les recomanacions d'EUCAST els resultats no es van considerar.

Tampoc hi ha definits punts de tall clínics per la interpretació dels resultats dels tests antibiòtics en *Legionella pneumophila*. El que sí que està definit en aquest document guia és el punt de tall epidemiològic, o MIC de soques tipus de *Legionella*. Es considera que si una soca aïllada presenta una MIC molt més elevada que el punt de tall epidemiològic en algun antibiòtic, aquesta soca té algun tipus de mecanisme de resistència.

Al comparar les MIC de les soques ambientals del nostre estudi amb la soca clínica aïllada del pacient afectat per LD, veiem que la soca clínica en general té MIC més altes per tots els antibiòtics testats. Les MIC més baixes van ser per levofloxacina, en el cas de fluoroquinolones, i azitromicina, en el cas dels macròlids. Aquest antibiòtics són els recomanats en el tractament de la legionel·losi ja que, a més a més, assoleixen concentracions intracel·lulars per sobre de la MIC sent clínicament més efectius . I és que la localització intracel·lular de legionel·la és un factor important a tenir en compte per un bon tractament i eficàcia dels antibiòtics en el pacient [71].

Els resultats dels tests antimicrobians de les nostres soques ambientals van ser similars i sense canvis en el període analitzat. Així doncs, tot i estar en un ambient amb una possible pressió selectiva, no hi va haver canvis que indiquessin tendència cap a la resistència. Pocs estudis han estudiat la susceptibilitat antibiòtica de soques de *Legionella pneumophila* sg 2-14 ja que tenen menys interès clínic que *Legionella pneumophila* sg 1 [68,69,91]. Malgrat això, aquests estudis control sobre la sensibilitat antibiòtica d'aquestes soques podrien ser importants en hospitals ja que (i) molts dels pacients pertanyen a grups de risc, (ii) treballadors que pertanyin a grups de risc poden estar exposats contínuament, (iii) el contacte amb antibiòtics en concentracions per sota la MIC podria causar pressió selectiva cap a l'adquisició de mecanismes de resistència, (iv) són bacteris amb reservoris ambientals però de difícil aïllament en mostres clíniques, (v) els canvis en els patrons antimicrobians de legionel·la serien detectats abans del seu aïllament en mostres clíniques i (vi) legionel·la no es transmet entre individus, per tant, l'adquisició de

resistència antibiòtica en soques ambientals és més problemàtica ja que aquesta sí que pot propagar-se.

I és que, el gènere *Legionella* és naturalment competent, amb taxes altes de HGT que proporcionen dinamisme i plasticitat al seu genoma per adaptar-se a diferents ambients i condicions [79]. I no només això, sinó que poden formar part de biofilms o infectar FLA, dos medis en els quals pot haver contacte amb altres bacteris oportunistes com el gènere *Pseudomonas*, el gènere *Chlamydia* o *Stenotrophomonas maltophilia*. Conseqüentment, l'intercanvi de material genètic entre aquests bacteris i legionel·la podria donar com a resultat l'adquisició de gens de resistència a antibiòtics [92].

Així doncs, tot i que legionel·la és un bacteri ambiental, la seva habilitat per infectar cèl·lules eucariotes i la seva capacitat per evadir la resposta de l'hoste han fet possible la seva emergència com un important, tot i que accidental, patògen dins la societat. Això fa pensar que encara estem lluny de conèixer totes les malalties infeccioses, especialment les causades per bacteris "fastidiosos" [93].

El progrés tecnològic i els nous nínxols ecològics, conseqüència del canvi que realitza l'humà a l'ambient, no minimitzen el risc de patir malalties infeccioses. Els canvis (inclús els petits, trivials o desapercebuts) que fem a l'ambient poden tenir efectes inesperats que destorben l'equilibri ecològic natural i és important entendre com ens afecten.

D'aquesta manera, es va realitzar l'estudi del gènere *Legionella* en diferents ecosistemes incloent l'ordre al qual pertany: l'ordre *Legionellales*. Aquest inclou altres patògens de l'ésser humà descrits com *Coxiella burnetii* o *Diplorickettsia massiliensis*.

L'ordre *Legionellales* es va estudiar en termes d'abundància, diversitat geogràfica i ambiental. L'ordre és poc abundant amb una freqüència del 0.1% a la majoria de mostres, més divers del que s'esperava, ubic (incloent ambients que no eren considerats reservoris) i globalment distribuït. Tenen una abundància menor però estan distribuïts geogràficament de manera similar a altres ordres de les gammaproteobacteria com l'ordre dels *Enterobacteriales* o *Pseudomonadales*.

L'ordre *Legionellales* té característiques en comú i que caracteritzen tots els seus gèneres: el cicle de vida intracel·lular i el T4BSS Dot/icm per injectar proteïnes efectores dins l'hoste i modificar el seu comportament pel seu avantatge [94]. Aquestes característiques probablement van ser adquirides per l'últim antecessor en comú i ara són compartides per l'ordre i estudiades en: *Legionella*, *Coxiella*, *Rickettsiella* o *Diplorickettsia* [95–97].

Aquest sistema està molt conservat, fet que podria demostrar que és un dels factors decisius perquè l'ordre pugui colonitzar diferents hostes eucariotes. Això és important des del punt de vista clínic, ja que algunes espècies de l'ordre són considerades patògens accidentals pels humans com el cas d'algunes espècies del gènere *Legionella*, *Coxiella burnetii* que causa la febre Q o, la recentment descrita, *Diplorickettsia massiliensis* [22]. Així doncs, els principals hostes d'aquest ordre intracel·lular són protozous com les FLA o alguns artròpodes, tot i que, són possibles candidats per acabar sent patògens accidentalment[98].

Segons els resultats de les anàlisis de les bases de dades d'estudis públics, es pot concloure que l'ordre té una diversitat més gran del que s'esperava. Aproximadament, el 25% de les dades metagenòmiques publicades contenen aquest ordre. Això té sentit, ja que, el seu cultiu és complicat i els bacteris poden passar desapercibuts al necessitar un hoste eucariota per créixer i multiplicar-se. Per tant, la metagenòmica és una eina d'elecció per estudiar la diversitat d'aquest ordre i altres bacteris intracel·lulars.

Aproximadament, la meitat de les mostres de sòls, ambients marins, plantes i aigua dolça, contenen l'ordre *Legionellales* i el total d'OTUs (Operational Taxonomic Unit) arriba a més d'un centenar. A arrel dels resultats, és important remarcar que no es coneixen hostes en ambients marins que pugin ser colonitzats per l'ordre, de moment.

Quan parlem d'ecosistemes artificials, l'ordre es troba present en un 95% de les mostres analitzades. Però a més, la diversitat de l'ordre en sistemes artificials i aigua potable és especialment alta.

La seva abundància és baixa amb un pic al voltant del 0.1% en la majoria de casos.

La distribució global a nivell d'OTU de l'ordre *Legionellales* s'observa també en ambdós casos: geogràficament i en diferents ecosistemes. Si analitzem les 5 OTU més abundants de l'ordre *Legionellales*, veiem que encara són espècies a descobrir i no es poden atribuir a cap espècie coneguda. Ja que, tot i ser les 5 OTU més abundants encara no s'han aïllat o seqüenciat a dia d'avui. En el cas de l'OTU més abundant, la similitud més propera és del 88% i curiosament és l'excepció en la distribució global de l'ordre: es troba associada a medis terrestres i a l'hemisferi Nord. En el cas de la segona OTU més abundant, la similitud més propera és del 97% amb una espècie de *Legionella* que indica fortament que és una espècie encara per identificar.

Si mirem l'especificitat de les mostres en els diferents ecosistemes veiem que la composició d'OTU en sòls i plantes és similar, que els ecosistemes relacionats amb l'aigua (aigua natural, aigua de sistemes artificials, aigua residual) comparteixen les mateixes OTU i que la composició

d'OTU en ambients marins és específica d'ella mateixa. En aquest sentit, els ambients marins contenen mostres amb diferents OTU de l'ordre però la majoria no es poden atribuir a cap espècie coneguda, el que ens fa veure que s'han d'estudiar encara els bacteris intracel·lulars en aquests ambients.

Les nostres mostres també corroboren la ubiqüitat de les OTU de l'ordre *Legionellales* inclús en mines que són ambients freds, foscos i amb pocs bacteris intracel·lulars coneguts. De fet, totes les mostres de la mina analitzades van ser positives i diverses amb un màxim de 52 OTU en una sola mostra. En canvi, algunes mostres de les reserves naturals d'Uppland van ser negatives, i les positives van ser menys diverses per l'ordre quan es considera que aquests ambients són el seu hàbitat natural. De totes maneres, l'abundància de les OTU de l'ordre *Legionellales* va ser similar amb un rang de 0 a 0,7% en ambdues preses de mostres. La diversitat d'aquestes mostres cobreix tot l'ordre amb l'excepció del gènere *Coxiella*.

No vam trobar OTU de FLA, que es consideren hostes naturals de l'ordre, ni en les mostres de reserves naturals d'Uppland ni en les de la mina. Aquest fet podria ser causat per la falta d'especificitat dels encebadors utilitzats o posar de manifest la possible varietat d'hostes que podria tenir l'ordre, no només FLA o fins i tot que puguin viure lliurement. Aquest últim fet sembla poc probable perquè tot l'ordre està adaptat a la vida intracel·lular i perquè no s'han vist casos de bacteris intracel·lulars, que normalment han patit algun tipus de reducció genòmica, que hagin tornat a ser extracel·lulars [99].

L'elevada prevalença de l'ordre *Legionellales* als ambients marins és un dels fets més sorprenents trobats al nostre estudi. Anteriorment, només havia estat descrit com un petit percentatge associat a corals [100] o en llacs hipersalins [101]. A més, que hagi estat trobat en ambients freds com en les mostres analitzades al nostre laboratori s'ha de destacar: prèviament només s'havia descrit en aigües de l'Antàrtic [102] o en illes del cercle polar Àrtic [103].

A nivell de gènere taxonòmic, veiem que *Legionella* és predominant en aigua dolça natural i sistemes artificials però, tot i ser poc conegut, el gènere *Aquicella* és abundant en sòls i plantes. La ubiqüitat del gènere *Legionella* en aquests sistemes és coneguda [104]. Un factor important perquè el gènere *Legionella* colonitzi eficaçment els sistemes artificials d'aigua és la temperatura. A més de ser termotolerant, la temperatura òptima del gènere és elevada (35-37°C) per un gènere considerat ambiental. Aquest fet es creu important perquè estigui present i creixi en sistemes d'aigua calenta artificial. Donant força a aquesta hipòtesi, la fracció de l'ordre *Legionellales* en les dades analitzades és més elevada quan les temperatures superen els 20°C, en aigua natural i mostres associades a mol·luscs, tot i que aquestes correlacions no són

estadísticament significatives. Sorprenentment, aquest fet canvia en ecosistemes com els sòls o sistemes artificials. Especialment en sòls, per sota els 15°C les fraccions semblen ser més elevades.

Així doncs, tot i que la influència de la temperatura en sistemes artificial pot ser discutida en la prevalença del gènere *Legionella*, l'augment de la temperatura global podria canviar la composició de microorganismes de molts ecosistemes i una de les conseqüències podria ser l'increment de la fracció no només del gènere *Legionella*, sinó també de l'ordre *Legionellales* en ecosistemes aquàtics. Aquest fet podria portar a l'emergència de patògens oportunistes dins d'aquest ordre com és el cas de *Legionella pneumophila*.

7. Conclusions

Conclusions

Encara queden molts aspectes a estudiar i a millorar en la prevenció de la legionel·losi. La complexa ecologia d'aquest gènere fa que les vies d'estudi i prevenció englobin molts camps: microbiologia, biologia molecular, medicina, ecologia, arquitectura, química, entre altres. Així doncs, com a conclusió final d'aquest treball, podem dir que hi ha una necessitat real d'incloure tots els mecanismes al nostre abast perquè aquestes mesures preventives siguin efectives, incloent factors que fins ara no es tenen en compte.

There are still many aspects to study and to improve regarding LD prevention. The complex ecology of *Legionella* involves many scientific areas to study and, ultimately, to prevent the disease, including: Microbiology, Molecular Biology, Medicine, Ecology, Architecture, Chemistry, among others. The conclusion of this work is that there is a real need for including all our knowledge to make this prevention more effective, and for that, we must include different factors not considered until now.

Per finalitzar el treball realitzat en aquesta tesi i en els articles de recerca podem concloure el següent:

To finish the work done in this thesis, research articles included, the following can be concluded:

7.1. Conclusions article I: *Legionella pneumophila* recurrently isolated in a Spanish hospital: Two years of antimicrobial resistance surveillance

- *Legionella pneumophila* va ser aïllada recurrentment a les mostres de l'hospital d'estudi, tot i el compliment estricte de les mesures preventives.
Even though the prevention measures were strictly followed in the hospital, *Legionella pneumophila* was recurrently isolated.
- *Legionella pneumophila* és altament eficaç colonitzant sistemes d'aigua artificials.
Legionella pneumophila colonizes efficiently artificial water systems.
- S'han de considerar noves mesures per una bona prevenció.
New measures need to be discussed and put into practice to improve prevention.
- El monitoratge dels patrons antimicrobians en soques amb reservoris ambientals i de difícil aïllament en mostres clíniques, com el gènere *Legionella*, pot ajudar a predir resistències o canvis en els patrons abans d'aïllar aquestes soques de mostres clíniques.

Antibiotic resistance monitoring may help to find resistance mechanisms in bacteria with environmental reservoirs but difficult to isolate from patients and to predict changes in strains before they are isolated from clinical samples.

- Les enquestes dels patrons antimicrobians han d'analitzar-se amb precaució i considerar els resultats en el tractament de pacients.

Those environmental surveys should be taken with caution but considered to treat patients with the appropriate antibiotic.

- És necessària una nova metodologia estàndard per dur a terme els estudis de sensibilitat antibiòtica de les legionel·les.

A new standard methodology is needed to perform antibiotic susceptibility tests in *Legionella*.

7.2. Conclusions article II: The all-intracellular order *Legionellales* is unexpectedly diverse, globally distributed and lowly abundant

- L'ordre intracel·lular *Legionellales* és ubic al medi ambient i geogràficament.

The all-host-adapted order *Legionellales* is ubiquitous, both geographically and environment-wise.

- L'ordre *Legionellales* té una prevalença variable: està present en la majoria de mostres de sistemes artificials, en la meitat de mostres de sòls, aigua dolça i al medi marí i poc present en la majoria de possibles hostes estudiats.

The prevalence of these bacteria varies widely, from being in almost all the samples from man-made environments, in half the samples in soil, freshwater and marine environments, and rarely observed in most hosts.

- L'abundància de l'ordre *Legionellales* en les mostres analitzades es normalment d'un 0.1% aproximadament arribant en algunes mostres a l'1%.

The abundance of *Legionellales* is typically around 0.1% rarely exceeding 1%.

- Les OTU identificades més comuns de l'ordre *Legionellales* no estan atribuïdes a cap espècie, la qual cosa posa de manifest la necessitat d'utilitzar estudis metagenòmics per a bacteris intracel·lulars.

The most common *Legionellales* OTUs are not well identified yet which emphasizes the need of metagenomics for future studies of host-adapted bacteria.

- Les aigües oceàniques i els ecosistemes freds són els ecosistemes amb més bacteris de l'ordre sense identificació.

Oceanic waters and cold environments seem to contain many yet-to-be discovered *Legionellales*.

8. Agraïments

Primer de tot, m'agradaria donar les gràcies a la meva directora de tesi, la **Emma Padilla**, per haver acceptat des del primer moment aquest repte. Ara que ja he acabat, i sense embuts, puc dir que és una superheroïna, d'aquestes que no porten capa pel carrer ni tenen logos de moda. La veritat és que l'admiro per ser una excel·lent professional, treballadora, mare i, crec que ho puc dir, amiga.

Una altra persona amb menció important és el meu segon supervisor, el **Lionel Guy**, a ell li dec que aquesta tesi estigui acabada. És un mag de la bioinformàtica i és un dels millors professionals que conec: llest, prudent i curiós. Em va acollir com una més de les seves estudiants, sense demanar res a canvi i sempre m'ha animat a millorar, a aprendre i a ser constant. La veritat que gràcies a ell crec que he après molt com a científica, sobretot fora de la meva zona de confort. Crec que com a 'PI' li espera un futur brillant, no només per la seva rigorositat científica, sinó també pel seu interès en les persones i en el grup que poc a poc va creixent.

A la **Pepa Pérez**. Ella va ser la que va confiar en mi per pujar al projecte Poseidon i navegar pels mars de la investigació. I ara, aquí estic, a punt de ser doctora (espero). Moltes gràcies per la teva confiança.

Al **Klas Hjort**. Ell va escoltar el meu entusiasme des del primer dia i m'ha fet discutir científicament com el que més. La meva estada a Uppsala (que m'ha canviat la vida podria dir) no hagués estat possible sense el seu suport.

Als meus **companys de Catlab**. A tots (que sou molts!!). No sabeu la sort que teniu de treballar en una gran família com és Catlab. Tots en algun moment heu contribuït a que això estigui passant. Sobretot, el meu estimat departament de Microbiologia (i Urgències!) tant de Catlab com del CST: torn matí, tarda i nit. Especialment, vull donar-li les gràcies a les meves profes més importants: la **Pili Arjona**, la **Juani Ribas**, l'**Àngels Abella** i l'**Elvira Martínez**. No només m'han ensenyat a llegir plaques i antibiogrames, "segones parts", Kligers/LIA o reas magistrals, també m'han ensenyat a ser millor persona i a veure que no sempre el camí més curt és el més ràpid. Elles són les meves tietes adoptives a Catlab, part de família, amb les quals puc parlar de tot. I per últim, a la meva #másquemilabmate **Elena**, des del primer moment vam tenir una connexió especial i vas passar a formar part de les meves millors amigues en uns mesos bastant complicats per mi. Només espero que no t'oblidis de tantes hores "al zulo" amb les nostres mostres de *Legionella* arreglant el món. Et trobo a faltar.

Al **Lionel Guy Group**: a la **Isa** per compartir oficina i obviar el meu ampli rang de sorolls al treballar.

Al **Dennis** pels fika espontanis a l'oficina i per ser sempre de gran ajuda amb els dubtes que tinc. I als que en algun moment han compartit la meva experiència científica: **Madeleine, Eric, Alberto**. Go, Legionella- busters, go!!!

Als meus companys del **D7:3** a BMC: **Fredrika, Linnéa, Michael, Omar, Hind, Jenny, Rachel, Marius, Nina, Kenesha, Hervé, Tiffaine, Chao Sa, Katrin, Lisa A, Gerrit, Lisa T, Serhiy, Erik W-Y, Erik L, Po,**

Greta, Doug i als PI: **Linus, Jocke, Dan** i **Diarmid**. Gràcies a tots per ajudar-me sempre en termes científics o simplement quan no trobo algun reactiu. No sé que hagués fet sense la vostra ajuda! Una especial menció a les dues pedres angulars del lab: la **Karin Hjort**, per ajudar-me sempre amb un somriure d'orella a orella, i la **Ulrika Lustig**, sense ella no tot funcionaria tan bé.

Als meus companys del **MST**: a **Mats** per ajudar-me sempre amb la seva experiència i a **Ana Maria, Gemma, Peter, Martin** i als nous MSTians que van arribar més tard. Per tots els divendres de delícies fika a les 10. Algunes tradicions no s'haurien de perdre mai.

Als meus **#amicsquesónfamília**. Després de tants anys junts, el hashtag descriu el que sento per vosaltres, sou part de la meva sang, tot i la distància: **Carles, Xavi, Laura, Cristina, Christian, Abigail, Alex** i **Jordi**.

A les meves **Bios**: el que va unir la Biologia, no ho pot separar ningú. Els bons records, acompanyen les vostres cares. Soc molt afortunada de tenir-vos a la meva vida, de veritat: **Noemí, Gemma, Neus** i **Laura**.

Als meus **Upplanders**. A tots aquells que en algun moment heu format part de la meva família a Uppsala i heu fet de les classes de Campus1477 un lloc on patir i passar-s'ho bé a la vegada. Heu fet i feu que la vida sigui interessant i divertida. La llista seria interminable però vull fer especial menció a algunes persones. A la meva primera amiga de veritat a Uppsala: la **Marta**, sento que algú em va enviar un tros de cel al conèixer-nos. Des d'aleshores els nostres destins i vida han estat units tot i que visqui a Madrid. Al **Lorenzo**, ets el meu espanyol adoptat, i un dels pilars fonamentals que tinc a Uppsala, sento que puc ser 100% jo mateixa i parlar i riure de tot amb tu. A la **Mercè**, la meva Master-selfie mig-catalana, la que s'entusiasma amb qualsevol activitat, la organitzadora dels mítics "Beer-revolution", la que ens incita a veure aurores boreals a qualsevol hora i, en definitiva, ens alegra els dies. A la **Maria**, ella ha fet que la paraula amiatat i germana torni a tenir sentit. Per totes les nostres converses interminables i pels nostres àudios de rècord, gràcies. A la **Julia**, alemanya del meu cor amb un do natural per la cuina, gràcies per ser-hi. Al **Francesco**, rei dels catalans, per les seves converses boges, pels balls de salsa junts i perquè quan està ell no hi ha "The sound of silence". Als meus veïns, **Laia** i **MthOs**, gràcies per ensenyar-me Blodsten i per fer que aquest somni es fes realitat. Pels diumenges de peli i sauna (que encara han de venir)! I al **Javi X**, però tu tens un apartat especial! A la meva **família**. La incondicional, la que no falla mai. Gràcies per tot, no puc expressar quant us estimo i us adoro. A les meves iaies que són unes valentes: la iaia **Magda** i la iaia **Rosa**. A la meva mare, **Carme** i al meu pare **Ramon**. A les meves tietes, **Amparo Antonia** (la que ha fet de taxista mil vegades en aquesta tesi), **Amèlia** i **Magda**. A les meves germanes, **Sandra** i **Magda**, que us estimo molt i som invencibles juntes (i a la meva germana adoptiva: **Marina**). I tot i que no hi siguin, als meus avis: **Amadeu** i **José**.

Per últim...Al meu senyor **X**. Crec que sense el teu suport mai hagués acabat aquest projecte. Vas confiar en mi des del primer dia i em vas animar a no rendir-me i a lluitar. M'he sentit més protegida

i més a casa gràcies a tu. Com ja et dic, ets el meu lloc (i olor!) favorit en aquest món. Després de la tesi, ets la millor cosa que he tret del Doctorat :P, i realment, em quedo curta de paraules per expressar i donar-te tantes gràcies.

Aquesta tesi doctoral mai hagués estat possible sense totes aquestes persones. Ara sí que sí, ja la tenim aquí!! No puc estar més contenta d'haver recorregut aquest viatge que tantes alegries (i alguns disgustos) m'ha portat. A tots i de tot cor...**Moltes gràcies!!!!**

9. Bibliografia

1. Rowbotham TJ. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol*. BMJ Publishing Group; 1980;33: 1179–83. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7451664>
2. Isberg RR, O'Connor TJ, Heidtman M. The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. *Nat Rev Microbiol*. Howard Hughes Medical Institute; 2009;7: 13–24. doi:10.1038/nrmicro1967
3. Fouque E, Trouilhé M-C, Thomas V, Hartemann P, Rodier M-H, Héchard Y. Cellular, biochemical, and molecular changes during encystment of free-living amoebae. *Eukaryot Cell*. American Society for Microbiology (ASM); 2012;11: 382–7. doi:10.1128/EC.05301-11
4. Boudarel H, Mathias J-D, Blaysat B, Grédiac M. Towards standardized mechanical characterization of microbial biofilms: analysis and critical review. *NPJ biofilms microbiomes*. Nature Publishing Group; 2018;4: 17. doi:10.1038/s41522-018-0062-5
5. Monroe D. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *PLoS Biol*. Public Library of Science; 2007;5: e307. doi:10.1371/journal.pbio.0050307
6. Oliva G, Sahr T, Buchrieser C. The Life Cycle of *L. pneumophila*: Cellular Differentiation Is Linked to Virulence and Metabolism. *Front Cell Infect Microbiol*. Frontiers; 2018;8: 3. doi:10.3389/fcimb.2018.00003
7. Manske C, Hilbi H. Metabolism of the vacuolar pathogen *Legionella* and implications for virulence. *Front Cell Infect Microbiol*. Frontiers; 2014;4: 125. doi:10.3389/fcimb.2014.00125
8. Shevchuk O, Jäger J, Steinert M. Virulence properties of the *legionella pneumophila* cell envelope. *Front Microbiol*. Frontiers Media SA; 2011;2: 74. doi:10.3389/fmicb.2011.00074
9. Mercante JW, Winchell JM. Current and emerging *Legionella* diagnostics for laboratory and outbreak investigations. *Clin Microbiol Rev*. American Society for Microbiology (ASM); 2015;28: 95–133. doi:10.1128/CMR.00029-14
10. Massis LM, Zamboni DS. Innate immunity to *legionella pneumophila*. *Front Microbiol*. Frontiers Media SA; 2011;2: 109. doi:10.3389/fmicb.2011.00109
11. Tenover FC, Arbeit RD, Goering R V, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. GUEST COMMENTARY Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *J Clin Microbiol*. 1995;33: 2233–2239. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC228385/pdf/332233.pdf>
12. Legionnaires' disease: revisiting the puzzle of the century. *Lancet*. Elsevier; 2016;388: 456–457. doi:10.1016/S0140-6736(16)31158-8
13. Hébert GA, Steigerwalt AG, Brenner DJ. *Legionella micdadei* species nova: Classification of a third species of *Legionella* associated with human pneumonia. *Curr Microbiol An Int J*. 1980;3: 255–257. doi:10.1007/BF02601800
14. Winn WC, Jr. Legionnaires disease: historical perspective. *Clin Microbiol Rev*. American Society for Microbiology (ASM); 1988;1: 60–81. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3060246>

15. Hilbi H, Hoffmann C, Harrison CF. *Legionella* spp. outdoors: colonization, communication and persistence. *Environ Microbiol Rep*. Blackwell Publishing Ltd; 2011;3: 286–296. doi:10.1111/j.1758-2229.2011.00247.x
16. Albert-Weissenberger C, Cazalet C, Buchrieser C. *Legionella pneumophila* - A human pathogen that co-evolved with fresh water protozoa [Internet]. *Cellular and Molecular Life Sciences* Birkhäuser-Verlag; Feb 27, 2007 pp. 432–448. doi:10.1007/s00018-006-6391-1
17. McDade JE, Shepard CC, Fraser DW, Tsai TR, Redus MA, Dowdle WR. Legionnaires' Disease. *N Engl J Med*. 1977;297: 1197–1203. doi:10.1056/NEJM197712012972202
18. Appelt S, Heuner K. The Flagellar Regulon of *Legionella*-A Review. *Front Cell Infect Microbiol*. Frontiers Media SA; 2017;7: 454. doi:10.3389/fcimb.2017.00454
19. Richards AM, Von Dwingelo JE, Price CT, Abu Kwaik Y. Cellular microbiology and molecular ecology of *Legionella*-amoeba interaction. *Virulence*. Taylor & Francis; 2013;4: 307–14. doi:10.4161/viru.24290
20. Christie PJ, Gomez Valero L, Buchrieser C. Biological Diversity and Evolution of Type IV Secretion Systems. *Curr Top Microbiol Immunol*. NIH Public Access; 2017;413: 1–30. doi:10.1007/978-3-319-75241-9_1
21. Van Schaik EJ, Chen C, Mertens K, Weber MM, Samuel JE. Molecular pathogenesis of the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. doi:10.1038/nrmicro3049
22. Subramanian G, Mediannikov O, Angelakis E, Socolovschi C, Kaplanski G, Martzloff L, et al. *Diplorickettsia massiliensis* as a human pathogen. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. Springer-Verlag; 2012;31: 365–369. doi:10.1007/s10096-011-1318-7
23. Garrity GM, Brown A, Vickers' ARM. *Tatlockia* and *FZuoribacter*: Two New Genera of Organisms Resembling *Legionella pneumophila*. *Int J Syst Bacteriol*. 1980; 609–614. Available: <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/30/4/ijsem-30-4-609.pdf?expires=1527847961&id=id&accname=guest&checksum=D60AFD9EEBE5E799ACEF0647ABA2CEC9>
24. Fields BS, Benson RF, Besser RE. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev*. American Society for Microbiology (ASM); 2002;15: 506–26. doi:10.1128/CMR.15.3.506-526.2002
25. Relich RF, Schmitt BH, Raposo H, Barker L, Blosser SJ, May M. *Legionella indianapolisensis* sp. nov., isolated from a patient with pulmonary abscess. *Int J Infect Dis*. Elsevier; 2018;69: 26–28. doi:10.1016/j.ijid.2018.01.024
26. Newton HJ, Ang DKY, van Driel IR, Hartland EL. Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. *Clin Microbiol Rev*. American Society for Microbiology (ASM); 2010;23: 274–98. doi:10.1128/CMR.00052-09
27. Yu VL, Plouffe JF, Pastoris MC, Stout JE, Schousboe M, Widmer A, et al. Distribution of *Legionella* Species and Serogroups Isolated by Culture in Patients with Sporadic Community-Acquired Legionellosis: An International Collaborative Survey. *J Infect Dis*. Oxford University Press; 2002;186: 127–128. doi:10.1086/341087
28. Říhová J, Nováková E, Husník F, Hypša V. *Legionella* Becoming a Mutualist: Adaptive Processes Shaping the Genome of Symbiont in the Louse *Polyplax serrata*. *Genome Biol Evol*. Oxford University Press; 2017;9: 2946–2957. doi:10.1093/gbe/evx217

29. Marre R, Medeiros AA, Pasculle2 AAW. Characterization of the Beta-Lactamases of Six Species of Legionella. *J Bacteriol.* 1982;151: 216–221. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC220229/pdf/jbacter00254-0226.pdf>
30. Franceschini N, Boschi L, Pollini S, Herman R, Perilli M, Galleni M, et al. Characterization of OXA-29 from Legionella (Fluoribacter) gormanii: molecular class D beta-lactamase with unusual properties. *Antimicrob Agents Chemother.* American Society for Microbiology (ASM); 2001;45: 3509–16. doi:10.1128/AAC.45.12.3509-3516.2001
31. Fu KP, Neu HC. Inactivation of beta-lactam antibiotics by Legionella pneumophila. *Antimicrob Agents Chemother.* American Society for Microbiology (ASM); 1979;16: 561–4. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/316686>
32. Gomez-Valero L, Rusniok C, Rolando M, Neou M, Dervins-Ravault D, Demirtas J, et al. Comparative analyses of Legionella species identifies genetic features of strains causing Legionnaires' disease. *Genome Biol.* 2014; doi:10.1186/s13059-014-0505-0
33. George, JR, Pine L, Reeves MW, Harrell' AWK. Amino Acid Requirements of Legionella pneumophila [Internet]. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY.* 1980. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC273381/pdf/jcm00176-0104.pdf>
34. Jules M, Buchrieser C. Legionella pneumophila adaptation to intracellular life and the host response: Clues from genomics and transcriptomics. *FEBS Lett.* No longer published by Elsevier; 2007;581: 2829–2838. doi:10.1016/J.FEBSLET.2007.05.026
35. Pine L, Hoffman PS, Malcolm GB, Benson RF, Franzus' MJ. Role of Keto Acids and Reduced-Oxygen-Scavenging Enzymes in the Growth of Legionella Species. *J Clin Microbiol.* 1986;23: 33–42.
36. Adeleke A, Pruckler J, Benson R, Rowbotham T, Halablab M, Fields B. Legionella-Like Amebal Pathogens—Phylogenetic Status and Possible Role in Respiratory Disease. *Emerg Infect Dis.* 1996;2: 225–230. doi:10.3201/eid0203.960311
37. Adeleke AA, Fields BS, Benson RF, Daneshvar MI, Pruckler JM, Ratcliff RM, et al. Legionella drozanskii sp. nov., Legionella rowbothamii sp. nov. and Legionella fallonii sp. nov.: three unusual new Legionella species. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001;51: 1151–1160. doi:10.1099/00207713-51-3-1151
38. Gomez-Valero L, Rusniok C, Carson D, Mondino S, Pérez-Cobas E, Rolando M, et al. More than 16,000 effectors in the Legionella genus genome provide multiple, 1 independent combinations for replication in human cells. doi:10.1101/350777
39. Burstein D, Amaro F, Zusman T, Lifshitz Z, Cohen O, Gilbert JA, et al. Genomic analysis of 38 Legionella species identifies large and diverse effector repertoires. *Nat Genet.* Nature Research; 2016;48: 167–175. doi:10.1038/ng.3481
40. Gomez-Valero L, Rusniok C, Jarraud S, Vacherie B, Rouy Z, Barbe V, et al. Extensive recombination events and horizontal gene transfer shaped the Legionella pneumophila genomes. *BMC Genomics.* BioMed Central; 2011;12: 536. doi:10.1186/1471-2164-12-536
41. Stone BJ, Kwai YA. Natural Competence for DNA Transformation by Legionella pneumophila and Its Association with Expression of Type IV Pili [Internet]. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY.* 1999. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC93526/pdf/jb001395.pdf>
42. David S, Sánchez-Busó L, Harris SR, Marttinen P, Rusniok C, Buchrieser C, et al.

- Dynamics and impact of homologous recombination on the evolution of *Legionella pneumophila*. Didelot X, editor. PLOS Genet. Public Library of Science; 2017;13: e1006855. doi:10.1371/journal.pgen.1006855
43. Fliermans CB, Cherry WB, Orrison LH, Smith SJ, Tison DL, Pope DH. Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. Appl Environ Microbiol. American Society for Microbiology (ASM); 1981;41: 9–16. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7013702>
 44. Boamah DK, Zhou G, Ensminger AW, O'Connor TJ. From Many Hosts, One Accidental Pathogen: The Diverse Protozoan Hosts of *Legionella*. Front Cell Infect Microbiol. Frontiers; 2017;7: 477. doi:10.3389/fcimb.2017.00477
 45. van Heijnsbergen E, van Deursen A, Bouwknecht M, Bruin JP, de Roda Husman AM, Schalk JAC. Presence and Persistence of Viable, Clinically Relevant *Legionella pneumophila* Bacteria in Garden Soil in the Netherlands. Appl Environ Microbiol. American Society for Microbiology (ASM); 2016;82: 5125–31. doi:10.1128/AEM.00595-16
 46. Taylor M, Mediannikov O, Raoult D, Greub G. Endosymbiotic bacteria associated with nematodes, ticks and amoebae. FEMS Immunol Med Microbiol. Wiley/Blackwell (10.1111); 2012;64: 21–31. doi:10.1111/j.1574-695X.2011.00916.x
 47. Denet E, Coupat-Goutaland B, Nazaret S, Pélandakis M, Favre-Bonté S. Diversity of free-living amoebae in soils and their associated human opportunistic bacteria. Parasitol Res. Springer Berlin Heidelberg; 2017;116: 3151–3162. doi:10.1007/s00436-017-5632-6
 48. Mba Medie F, Ben Salah I, Henrissat B, Raoult D, Drancourt M. Mycobacterium tuberculosis Complex Mycobacteria as Amoeba-Resistant Organisms. Tailleux L, editor. PLoS One. Public Library of Science; 2011;6: e20499. doi:10.1371/journal.pone.0020499
 49. Rowbotham TJ. Isolation of *Legionella pneumophila* from clinical specimens via amoebae, and the interaction of those and other isolates with amoebae. J Clin Pathol. BMJ Publishing Group; 1983;36: 978–86. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6350372>
 50. Faulkner G, Garduño RA. Ultrastructural analysis of differentiation in *Legionella pneumophila*. J Bacteriol. American Society for Microbiology (ASM); 2002;184: 7025–41. doi:10.1128/JB.184.24.7025-7041.2002
 51. Greub G, Raoult D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. Clin Microbiol Rev. American Society for Microbiology (ASM); 2004;17: 413–33. doi:10.1128/CMR.17.2.413-433.2004
 52. Flemming H-C, Wingender J. The biofilm matrix. Nat Rev Microbiol. Nature Publishing Group; 2010;8: 623–633. doi:10.1038/nrmicro2415
 53. Declerck P. Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. Environ Microbiol. Wiley/Blackwell (10.1111); 2010;12: 557–566. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02025.x
 54. Wimpenny J, Manz W, Szewzyk U. Heterogeneity in biofilms: Table 1. FEMS Microbiol Rev. Wiley/Blackwell (10.1111); 2000;24: 661–671. doi:10.1111/j.1574-6976.2000.tb00565.x
 55. Konishi T, Yamashiro T, Koide M, Nishizono A. Influence of temperature on growth of *Legionella pneumophila* biofilm determined by precise temperature gradient incubator.

56. Swanson MS, Hammer BK. LEGIONELLA PNEUMOPHILA PATHOGENESIS: A Fateful Journey from Amoebae to Macrophages. *Annu Rev Microbiol.* 2000;54: 567–613. Available: <https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.micro.54.1.567>
57. Abu Khweek A, Amer AO. Factors Mediating Environmental Biofilm Formation by *Legionella pneumophila*. *Front Cell Infect Microbiol.* *Frontiers Media SA*; 2018;8: 38. doi:10.3389/fcimb.2018.00038
58. Whiley H, Taylor M. *Legionella* detection by culture and qPCR: Comparing apples and oranges. *Crit Rev Microbiol.* Taylor & Francis; 2016;42: 65–74. doi:10.3109/1040841X.2014.885930
59. Schrammel B, Petzold M, Cervero-Aragó S, Sommer R, Lück C, Kirschner A. Persistent presence of outer membrane epitopes during short- and long-term starvation of five *Legionella pneumophila* strains. *BMC Microbiol.* BioMed Central; 2018;18: 75. doi:10.1186/s12866-018-1220-x
60. Al-Bana BH, Haddad MT, Garduño RA. Stationary phase and mature infectious forms of *Legionella pneumophila* produce distinct viable but non-culturable cells. *Environ Microbiol.* 2014;16: 382–395. doi:10.1111/1462-2920.12219
61. Yamamoto H, Sugiura M, Kusunoki S, Ezaki T, Ikedo M, Yabuuchit E. Factors Stimulating Propagation of Legionellae in Cooling Tower Water [Internet]. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY.* 1992. Available: <http://aem.asm.org/>
62. Correia AM, Ferreira JS, Borges V, Nunes A, Gomes B, Capucho R, et al. Probable Person-to-Person Transmission of Legionnaires' Disease. *N Engl J Med.* Massachusetts Medical Society; 2016;374: 497–498. doi:10.1056/NEJMc1505356
63. Garcia-Vidal C, Labori M, Viasus D, Simonetti A, Garcia-Somoza D, Dorca J, et al. Rainfall is a risk factor for sporadic cases of *Legionella pneumophila* pneumonia. *PLoS One.* Public Library of Science; 2013;8: e61036. doi:10.1371/journal.pone.0061036
64. Garcia-Vidal C, Labori M, Viasus D, Simonetti A, Garcia-Somoza D, Dorca J, et al. Rainfall Is a Risk Factor for Sporadic Cases of *Legionella pneumophila* Pneumonia. Kwaik YA, editor. *PLoS One.* Public Library of Science; 2013;8: e61036. doi:10.1371/journal.pone.0061036
65. Valero N, de Simón M, Gallés P, Izquierdo N, Arimon J, González R, et al. Street Cleaning Trucks as Potential Sources of *Legionella pneumophila*. *Emerg Infect Dis.* Centers for Disease Control and Prevention; 2017;23: 1880–1882. doi:10.3201/eid2311.161390
66. Coscollá M, Fenollar J, Escribano I, González-Candelas F. Legionellosis outbreak associated with asphalt paving machine, Spain, 2009. *Emerg Infect Dis.* Centers for Disease Control and Prevention; 2010;16: 1381–7. doi:10.3201/eid1609.100248
67. Muder RR, Yu VL. Infection Due to *Legionella* Species Other Than *L. pneumophila*. *Clin Infect Dis.* Oxford University Press; 2002;35: 990–998. doi:10.1086/342884
68. De Giglio O, Napoli C, Lovero G, Diella G, Rutigliano S, Caggiano G, et al. Antibiotic susceptibility of *Legionella pneumophila* strains isolated from hospital water systems in Southern Italy. *Environ Res.* 2015;142: 586–590. doi:10.1016/j.envres.2015.08.013
69. Torre I, Alfano R, Borriello T, De Giglio O, Iervolino C, Montagna MT, et al. Environmental surveillance and in vitro activity of antimicrobial agents against

- Legionella pneumophila* isolated from hospital water systems in Campania, South Italy: a 5-year study. *Environ Res.* 2018;164: 574–579. doi:10.1016/j.envres.2018.02.030
70. Bruin J.P., Ijzerman E., Den Boer J.W., Mouton J.W., Diederer B.M. Wild type MIC distribution and epidemiological cut-off values in clinical *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates. *Clin Microbiol Infect.* 2010; doi:http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03239.x
 71. Sikora A, Gładysz I, Koziół-Montewka M, Wójtowicz-Bobin M, Stańczak T, Matuszewska R, et al. Assessment of antibiotic susceptibility of *Legionella pneumophila* isolated from water systems in Poland. *Ann Agric Environ Med. Institute of Rural Health;* 2017;24: 66–69. doi:10.5604/12321966.1234048
 72. Thornsberry C, Kirven LA. β -Lactamase of the Legionnaires' bacterium. *Curr Microbiol. Springer-Verlag;* 1978;1: 51–54. doi:10.1007/BF02601708
 73. Boschi L, Mercuri PS, Riccio ML, Amicosante G, Galleni M, Fr Re J-M, et al. The *Legionella* (*Fluoribacter*) *gormanii* Metallo- β -Lactamase: a New Member of the Highly Divergent Lineage of Molecular-Subclass B3 β -Lactamases. 2000;44: 1538–1543. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC89909/pdf/ac001538.pdf>
 74. Shadoud L, Almahmoud I, Jarraud S, Etienne J, Larrat S, Schwebel C, et al. Hidden Selection of Bacterial Resistance to Fluoroquinolones In Vivo: The Case of *Legionella pneumophila* and Humans. *EBioMedicine.* 2015;2: 1179–1185. doi:10.1016/j.ebiom.2015.07.018
 75. Bruin JP, Koshkolda T, Ijzerman EPF, Luck C, Diederer BMW, Den Boer JW, et al. Isolation of ciprofloxacin-resistant *Legionella pneumophila* in a patient with severe pneumonia. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69: 2869–2871. doi:10.1093/jac/dku196
 76. Scaturro M, Losardo M, De Ponte G, Ricci ML. Comparison of three molecular methods used for subtyping of *Legionella pneumophila* strains isolated during an epidemic of Legionellosis in Rome. *J Clin Microbiol. American Society for Microbiology;* 2005;43: 5348–50. doi:10.1128/JCM.43.10.5348-4350.2005
 77. Gaia V, Fry NK, Afshar B, Lück PC, Meugnier H, Etienne J, et al. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol. American Society for Microbiology (ASM);* 2005;43: 2047–52. doi:10.1128/JCM.43.5.2047-2052.2005
 78. Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fry NK, Lück PC. Addition of *neuA*, the gene encoding N-acetylneuraminyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *J Clin Microbiol. American Society for Microbiology (ASM);* 2007;45: 1965–8. doi:10.1128/JCM.00261-07
 79. Khodr A, Kay E, Gomez-Valero L, Ginevra C, Doublet P, Buchrieser C, et al. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Legionella* [Internet]. *Infection, Genetics and Evolution Elsevier;* Sep 1, 2016 pp. 108–122. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134816301678?via%3Dihub>
 80. Quero S, García-Núñez M, Párraga-Niño N, Barrabeig I, Pedro-Botet ML, de Simon M, et al. Discriminatory usefulness of pulsed-field gel electrophoresis and sequence-based typing in *Legionella* outbreaks. *Future Microbiol. Future Medicine Ltd London, UK ;* 2016;11: 757–765. doi:10.2217/fmb-2015-0030

81. Lee J V, Lai S, Exner M, Lenz J, Gaia V, Casati S, et al. An international trial of quantitative PCR for monitoring *Legionella* in artificial water systems. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.04957.x
82. Díaz-Flores Á, Carlos Montero J, Castro FJ, Alejandres EM, Bayón C, Solís I, et al. In Silico identification of pathogenic strains of *Cronobacter* from Biochemical data reveals association of inositol fermentation with pathogenicity. 2011; doi:10.1186/s12866-015-0423-7
83. Cervero-Aragó S, Sommer R, Araujo RM. Effect of UV irradiation (253.7 nm) on free *Legionella* and *Legionella* associated with its amoebae hosts. *Water Res.* 2014;67: 299–309. doi:10.1016/j.watres.2014.09.023
84. Storey M V., Winiecka-krusnell J, Ashbolt NJ, Stenström T. The Efficacy of Heat and Chlorine Treatment against Thermotolerant Acanthamoebae and Legionellae. *Scand J Infect Dis.* 2004;36: 656–662. doi:10.1080/00365540410020785
85. Winn WC, Myerowitz RL. The pathology of the legionella pneumonias: A review of 74 cases and the literature. *Hum Pathol.* W.B. Saunders; 1981;12: 401–422. doi:10.1016/S0046-8177(81)80021-4
86. Epstein S. The phenomenon of microbial uncultivability. *Curr Opin Microbiol.* 2013;16: 636–642. doi:10.1016/j.mib.2013.08.003
87. Marston BJ, Lipman HB, Breiman RF. Surveillance for Legionnaires' disease. Risk factors for morbidity and mortality. *Arch Intern Med.* 1994;154: 2417–22. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7979837>
88. Moliner C, Ginevra C, Jarraud S, Flaudrops C, Bedotto M, Couderc C, et al. Rapid identification of *Legionella* species by mass spectrometry. *J Med Microbiol.* Microbiology Society; 2010;59: 273–284. doi:10.1099/jmm.0.014100-0
89. Pendland SL, Martin SJ, Chen C, Schreckenberger PC, Danziger LH. Comparison of charcoal- and starch-based media for testing susceptibilities of *Legionella* species to macrolides, azalides, and fluoroquinolones. *J Clin Microbiol.* American Society for Microbiology (ASM); 1997;35: 3004–6. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9350781>
90. Rhomberg PR, Bale MJ, Jones RN. Application of the Etest to antimicrobial susceptibility testing of *Legionella* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis.* Elsevier; 1994;19: 175–8. doi:10.1016/0732-8893(94)90063-9
91. Al-Matawah QA, Al-Zenki SF, Qasem JA, Al-Waalan TE, Ben Heji AH. Detection and Quantification of *Legionella pneumophila* from Water Systems in Kuwait Residential Facilities. *J Pathog. Hindawi;* 2012;2012: 1–5. doi:10.1155/2012/138389
92. Moliner C, Fournier P-E, Raoult D. Genome analysis of microorganisms living in amoebae reveals a melting pot of evolution. *FEMS Microbiol Rev.* 2010;34: 281–94. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00209.x
93. Honigsbaum M. Legionnaires' disease: revisiting the puzzle of the century. *Lancet.* Elsevier; 2016;388: 456–457. doi:10.1016/S0140-6736(16)31158-8
94. Qiu J, Luo Z-Q. *Legionella* and *Coxiella* effectors: strength in diversity and activity. *Nat Rev Microbiol.* 2017;15: 591–605. doi:10.1038/nrmicro.2017.67
95. Segal G, Feldman M, Zusman T. The Icm/Dot type-IV secretion systems of *Legionella*

- pneumophila* and *Coxiella burnetii*. FEMS Microbiol Rev. 2005;29: 65–81. doi:10.1016/j.femsre.2004.07.001
96. Leclerque A, Kleespies RG. Type IV secretion system components as phylogenetic markers of entomopathogenic bacteria of the genus *Rickettsiella*. FEMS Microbiol Lett. 2008;279: 167–173. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.01025.x
 97. Mathew MJ, Subramanian G, Nguyen T-T, Robert C, Mediannikov O, Fournier P-E, et al. Genome sequence of *Diplorickettsia massiliensis*, an emerging *Ixodes ricinus*-associated human pathogen. J Bacteriol. 2012;194: 3287. doi:10.1128/JB.00448-12
 98. Lamoth F, Greub G. Amoebal pathogens as emerging causal agents of pneumonia. FEMS Microbiol Rev. 2010;34: 260–280. doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00207.x
 99. Toft C, E Andersson SG. Evolutionary microbial genomics: insights into bacterial host adaptation. 2010; doi:10.1038/nrg2798
 100. Lawler SN, Kellogg CA, France SC, Clostio RW, Brooke SD, Ross SW. Coral-Associated Bacterial Diversity Is Conserved across Two Deep-Sea Anthothela Species. Front Microbiol. 2016;7: 458. doi:10.3389/fmicb.2016.00458
 101. Naghoni A, Emtiazi G, Amoozegar MA, Cretoiu MS, Stal LJ, Etemadifar Z, et al. Microbial diversity in the hypersaline Lake Meyghan, Iran. Sci Rep. Nature Publishing Group; 2017;7: 11522. doi:10.1038/s41598-017-11585-3
 102. Carvalho FRS, Nastasi FR, Gamba RC, Foronda AS, Pellizari VH. Occurrence and Diversity of Legionellaceae in Polar Lakes of the Antarctic Peninsula. Curr Microbiol. Springer-Verlag; 2008;57: 294–300. doi:10.1007/s00284-008-9192-y
 103. Ntougias S, Polkowska Ż, Nikolaki S, Dionyssopoulou E, Stathopoulou P, Doudoumis V, et al. Bacterial Community Structures in Freshwater Polar Environments of Svalbard. Microbes Environ. Japanese Society of Microbial Ecology · The Japanese Society of Soil Microbiology; 2016;31: ME16074. doi:10.1264/jsme2.ME16074
 104. Sakamoto R. Legionnaire's disease, weather and climate. Bull World Health Organ. 2015;93: 435–6. doi:10.2471/BLT.14.142299

Referències de llibres, webs i altres documents:

- (ECDC) Disease data from ECDC Surveillance Atlas. Retrieved in July 2018 from: <https://ecdc.europa.eu/en/legionnaires-disease/surveillance/atlas>
- Butlletí epidemiològic de Catalunya (Butlletí Epidemiològic de Catalunya, BEC, volum 39 número 2, Febrer 2018). Retrieved in August 2018 from: https://scientiasalut.gencat.cat/bitstream/handle/123456789/3611/BEC_2018_39_02.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- (LPSN) List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Retrieved in July 2018 from: <http://www.bacterio.net/legionella.html>

- ISO 11731:2007. "Water quality and enumeration of *Legionella*".
- (EWGLI SBT database). European Working Group for Legionella Infections. EWGLI Sequence-Based Typing (SBT) Database for Legionella pneumophila. Retrieved in April 2018 from: http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php
- (EUCAST guidance document on Legionella). "The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST guidance document on Legionella. Version from 8 December 2017. (<http://www.eucast.org>)" Retrieved in April 2018 from: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Legionella_guidance_document_20171208.pdf
- Mensa, J., et al., 2018. "Guía terapéutica antimicrobiana (antimicrobial therapy guide)" Spanish guide. Editorial Antar.
- (CDC protocols). PulseNet Methods: PFGE protocol. Retrieved in April 2017 from: <https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/pfge.html>
- Ausina V, et al, 2005. "Procedimientos en microbiología clínica. 20. Diagnóstico microbiológico y control de la legionelosis." Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica. Retrieved in January 2017 from: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia20.pdf>
- Coll P, et al, 2005. "Procedimientos en microbiología clínica.18. Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología." Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica. Retrieved in January 2017 from: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia18.pdf>
- Bartram et al. 2007. "Legionella and the prevention of legionellosis". World Health Organization. ISBN 92 4 156297 8 (NLM classification: WC 200).
- Real Decreto 865/2003, de 4 de julio, por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis. (BOE 171, 2003).
- Horizon 2020 Research and Innovation Programme, Poseidon project website. Retrieved in January 2017 from: <http://www.poseidonproject.eu/>

10. Informació adicional

10.1. Beques, pòsters i assistència a congressos

Beques:

- **ESCMID Travel Grant Awardee**

Tíscar Graells

28th ECCMID European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.
21st -24th April 2018. Madrid (Spain).

Pòsters:

- **Antibiotic susceptibility of environmental strains and clinical strain of *Legionella spp* from a hospital nearby Barcelona (Spain).**

Tíscar Graells, Elena Jiménez, Emma Padilla, Pepa Pérez-Jové

4th ESGLI Conference (ESCMID Study Group for Legionella Infections. 22nd -23rd
September 2016. Amsterdam (The Netherlands).

- **McFarland methodology for quantification of *Legionella spp*.**

Tíscar Graells, Elena Jiménez, Emma Padilla, Pepa Pérez-Jové

4th ESGLI Conference (ESCMID Study Group for Legionella Infections. 22nd -23rd
September 2016. Amsterdam (The Netherlands).

- **Colonization and persistence of *Legionella pneumophila* ST328 in a hospital.**

Tíscar Graells, Lionel Guy, Emma Padilla

9th International Conference on *Legionella*. 26th – 30th September 2017. Rome
(Italy).

- **Looking into microbial dark matter in sediment and soil samples using metagenomics**

Tíscar Graells, Madeleine Larsson, Helena Ishak, Lionel Guy

9th International Conference on *Legionella*. 26th – 30th September 2017. Rome
(Italy).

- **Metagenomic exploration of environmental samples: on the lookout for potential novel pathogens**

Tíscar Graells, Madeleine Larsson, Helena Ishak, Lionel Guy

28th ECCMID European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.
21st -24th April 2018. Madrid (Spain).

Assistència:

- **VI Congrès de *Legionella* i qualitat ambiental**

11 i 12 de febrer de 2015. Terrassa (Barcelona, Spain)

10.2. Articles no inclosos a la tesi

Cruz J, Hooshmand S, Graells T, Andersson M, Malmström J, Wu ZGZGZ, et al. High pressure inertial focusing for separating and concentrating bacteria at high throughput. J Micromechanics Microengineering. IOP Publishing; 2017;27: 084001.

doi:10.1088/1361-6439/aa6b14

11. Annex I: Articles